



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN INTEGRAL DEL EFECTO TÓXICO PULMONAR DE LAS PARTÍCULAS  
SUSPENDIDAS ( $PM < 2.5 \mu m$ ) DE LA CIUDAD DE MÉXICO EN COBAYOS (*Cavia porcellus*)  
SENSIBILIZADOS A OVOALBUMINA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**FALCÓN RODRÍGUEZ CARLOS IVÁN**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, INER.

**COMITÉ TUTOR: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ**

CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM.

**DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

**MÉXICO, CD. MX., AGOSTO., 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

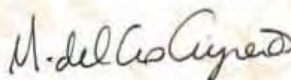
Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de febrero de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **FALCÓN RODRÍGUEZ CARLOS IVÁN** con número de cuenta **300106596**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN INTEGRAL DEL EFECTO TÓXICO PULMONAR DE LAS PARTÍCULAS SUSPENDIDAS (PM<2.5µm) DE LA CIUDAD DE MÉXICO EN COBAYOS (*Cavia porcellus*)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**:

Presidente: DRA. ISABEL GARCÍA PELAEZ  
Vocal: DR. ANDRES ELIU CASTELL RODRIGUEZ  
Secretario: DRA. IRMA AURORA ROSAS PEREZ  
Suplente: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
Suplente: DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de junio de 2017



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**

**A CONACYT por el apoyo recibido: Becario 233789**

**A los miembros del comité tutor:**

**Dra. Patricia Segura Medina**

**Dra. Irma Aurora Rosas Pérez**

**Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre**

## **Agradecimientos**

**A la Secretaria de Ciencia y Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECITI) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto (042/2013; 014/2014; 019/2015).**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Ismael Cosío Villegas de la Secretaria de Salud.**

**Al Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-Zacatenco) del IPN.**

**Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**A:**

**MC. Brisa Samara Reyes Nava.**

**Ing. en Biot. Paulina Mercadillo Herrera.**

**Ing. en Biot. Giuliano Juventino Hernández.**

**Ing. en Biot. Santiago Hernández Tena.**

**Biól. Larisa Idania García Alonso.**

**Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda.**

**Biól. Iris Rosario Camacho Espinoza**

**M en C. Rodolfo Angulo Olais.**

**MC. Karen Cristhel Meneses Soberano**

**Dr. Luis Jiménez Álvarez.**

**Dra. Andrea de Vizcaya Ruiz.**

**Dr. Álvaro Román Osornio Vargas.**

## **Dedicatoria**

A Dios por su grandeza y benevolencia, por sus obstáculos y virtudes.

A mis padres, por su gran ejemplo de trabajo y perseverancia, y sobre todo por la gran abundancia que me han dado... Son y serán un gran pilar en mi vida, los amo.

A mis hermanos, por lo vivido y lo que falta por vivir. A mi familia por su gran paciencia, motivación, cariño y amor.

No tengo palabras para expresar todo el apoyo que me han brindado...

A mi esposa Sonia María, por su gran, por ser parte de este camino, por sus consejos, cariño y amor.

"Encomiéndate a Dios de todo corazón, que muchas veces suele llover sus misericordias en el tiempo que están más secas las esperanzas"

Miguel de Cervantes Saavedra

A Paty, mi tutora, por abrirme las puertas del laboratorio de hiperreactividad bronquial en el INER, por confiar en mí como persona y científico. Por aguantar mis locuras y sobre todo por ser una amiga en la cual puedo confiar ¡Muchas gracias!

A Rodolfo Angulo, Andrea de Vizcaya, Álvaro Osornio, Irma Rosas, Natalia Manzano, por ser más que un grupo de académicos.

A Brisa Reyes, Paulina Mercadillo, Giuliano Hernández, Santiago Hernández, Larisa García, Karen Meneses, Sandra Hernández e Iris Camacho, por su ayuda incondicional en todo el proceso de esta tesis. Gracias, no olvidare los momentos que pasamos riendo y aprendiendo.

"Una máquina puede hacer el trabajo de 50 hombres corrientes.

Pero no existe ninguna máquina que pueda hacer el trabajo de un hombre extraordinario"

Elbert Hubbard

A mis amigos: Aarón, Miguel, Marco, Sac, Karla, Diana Celeste, Esthela, Yolitzi, Alejandra, Juan, Alfredo, Cynthia, Rebeca, Sandy, Iris, Arisbel, Paty, Laura, Adriana, Martha e Isabel, por sus buenas vibras y motivaciones, por estar allí cuando es necesario, y aunque no nos frecuentemos, sé que el apoyo siempre está presente en cada momento. ¡Muchas gracias!

Dedicado a Larisa por la confianza, las porras y las risas durante los experimentos.

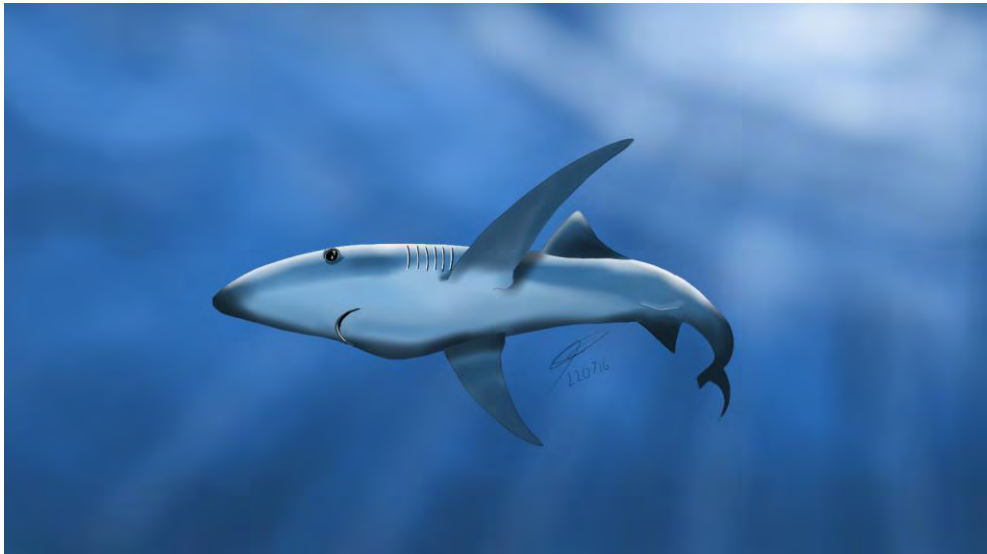
“Un amigo es uno que lo sabe todo de ti y a pesar de ello te quiere”

Elbert Hubbard

A los cobayos, sin ellos este proyecto no sería posible. Dedicado a ustedes de todo corazón...

“Antes de ser hombres de ciencia, deberíamos ser hombres”

Albert Einstein



“I don't try to understand everything in nature.

I just look at it and enjoy it”

Bob Ross, 1988.

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	i
1 Resumen .....	1
2 Abstract .....	3
3 INTRODUCCIÓN .....	5
3.1 Asma .....	5
3.2 Fisiopatogenia del asma .....	6
3.3 Reacción inmunitaria dependiente de inmunoglobulinas .....	10
3.4 Los adyuvantes en los modelos de sensibilización alérgicas .....	12
3.5 Proteína CC16 .....	13
3.6 Sistema metabólico de xenobioticos en el pulmón .....	14
3.7 Contaminación atmosférica .....	16
3.7.1 La contaminación en la Ciudad de México .....	17
3.7.2 El material particulado .....	18
4 ANTECEDENTES .....	23
4.1 Contaminación y Asma .....	24
4.2 Estudios en el modelo animal de sensibilización .....	27
4.3 Asma y citocromo P450 .....	30
5 JUSTIFICACIÓN .....	31
6 HIPÓTESIS .....	32
7 OBJETIVOS .....	32
7.1 Objetivo general .....	32
7.2 Objetivos particulares .....	32
8 METODOLOGÍA .....	33
8.1 Los animales .....	33
8.2 Diseño Experimental .....	33
8.3 El sistema concentrador de partículas .....	36
8.4 Pletismografía barométrica .....	38
8.5 Lavado bronco-alveolar .....	40
8.6 Histología y análisis morfométrico .....	40
8.7 Ensayos de ELISA .....	42
8.8 Ensayo Quimiluminisencia bio-plex Pro .....	43
8.9 Ensayo de Actividad CYP450 .....	43
8.10 Análisis del PM2.5 .....	45
8.11 Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PHAs) .....	45
8.12 Análisis de endotoxinas y glucano .....	46
8.13 Análisis estadístico .....	46
9 RESULTADOS .....	47
9.1 Gravimetría .....	47
9.2 Composición inorgánica del PM2.5 .....	48
9.3 Composición orgánica del PM2.5 .....	48
9.4 Composición de los elementos biogénicos del PM2.5 .....	50
9.5 Fisiología Respiratoria .....	50
9.6 Inflamación pulmonar .....	52
9.7 Biomarcadores de asma y daño pulmonar .....	53



9.8	Morfología pulmonar .....	55
9.9	Perfil inmunológico (Th1/Th2) .....	57
9.10	Metabolismo pulmonar de xenobioticos .....	60
10	DISCUSIÓN .....	61
11	CONCLUSIÓN .....	69
12	LITERATURA CITADA.....	70
13	ANEXO I (Artículo requisito).....	80
14	ANEXO II (Aprobación del proyecto).....	90

## Abreviaturas

AF: Aire filtrado  
Al: Aluminio  
Al(OH)<sub>3</sub>: Hidróxido de aluminio  
AHR: Receptor de hidrocarburos aromáticos  
ARNT: Translocador del receptor de hidrocarburos aromáticos  
BAL: Líquido bronco alveolar  
BAMSE: Estudio epidemiológico Children, Allergy, Milieu, Stockholm, Epidemiological Survey.  
Cl: Cloro  
CO: Monóxido de carbón  
COV: Compuestos orgánicos volátiles  
Cr: Cromo  
Cu: Cobre  
CYP450: Citocromo P450  
CCSP: Proteína secretora de la célula club  
DEP: Partículas de escape de diésel  
EROD Etoxiresorufina o-detilasa  
ESCAPE: Estudio epidemiológico, European collaborative European Study of Cohorts for Air Pollution Effects.  
FcεRI: Receptor de alta afinidad para IgG  
FcγRIII: Receptor de alta afinidad para IgE  
Fe: Hierro  
FEV<sub>1</sub>: Volumen del flujo espiratorio forzado en el primer segundo  
FVC: Capacidad vital forzada  
K: Potasio  
HIF-1α: Factor de hipoxia inducible 1α  
HNO<sub>3</sub> : Nitrato de hidrógeno  
NH<sub>3</sub>: Amonio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno  
Mg: Manganeseo  
Mn: Magnesio  
MROD: Metoxiresorufina o-detilasa  
Na: Sodio  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
Ni: Níquel  
NO: óxido nítrico  
NO<sub>2</sub>: Dióxido de nitrógeno  
NS+AF: No sensibilizado + aire filtrado  
NS+PM<sub>2.5</sub>: No sensibilizados + partículas finas  
LPS: Lipopolisacáridos  
OVA: Ovoalbúmina  
O<sup>-2</sup>: Anión superóxido  
O<sub>3</sub>: Ozono  
PAH: Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Pb: Plomo  
PENH: Pausa incrementada  
PEP: Pico del flujo espiratorio  
PIAMA: Estudio epidemiológico, Dutch Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy.  
PIP: Pico del flujo inspiratorio  
PM: Material particulado  
PM10: Diámetro aerodinámico es menor de 10 $\mu$ m o partículas gruesas  
PM2.5: Diámetro aerodinámico es menor de 2.5 $\mu$ m o partículas finas  
ROFA: Partículas de residuos de combustibles  
ROS: Especies reactivas del oxígeno  
RT: Tiempo de relajación  
SAPALDIA: Estudio epidemiológico, Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults.  
SCGB1A1: Secretoglobina 1A1  
SCP: Sistema concentrador de partículas  
SO<sub>2</sub>: Dióxido de azufre  
SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: Sulfato  
S+Adj+AF: Sensibilizado + adyuvante + aire filtrado  
S+Adj+PM2.5: Sensibilizado + adyuvante + partículas finas  
S+AF: Sensibilizado + aire filtrado  
S+PM2.5: Sensibilizado + partículas finas  
TiO<sub>2</sub>: Dióxido de titanio  
Te: Tiempo de espiración  
UAP: Partículas del valle de Utah  
UFP: Partículas ultra finas  
V: Vanadio  
ZMCM: Zona metropolitana de la Ciudad de México  
Zn: Zinc

# 1 Resumen

El asma es una enfermedad crónica de las vías aéreas, que se caracteriza por la inflamación de tipo crónico y obstrucción reversible de los bronquios y bronquiolos con o sin broncodilatadores. Alrededor del mundo, más de 300 millones de personas padecen asma, sin embargo, se ha pronosticado que para el año 2025 se adicionarán 100 millones más de pacientes. Este cambio, probablemente está relacionado con la contaminación ambiental, ya que los países industrializados presentan altos índices de enfermedades alérgicas. La contaminación ambiental es un serio problema de salud pública alrededor del mundo, especialmente en la Ciudad de México, debido a la industrialización iniciada en la década de los 80's. En esta zona, el tráfico vehicular está formado por más de 5.5 millones de automotores que producen grandes cantidades de material particulado debido a la combustión de diésel y gasolinas de automóviles, autobuses y camiones. El material particulado contiene una gran cantidad de elementos tales como: hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales, no metales, metaloides y elementos de transición interna, compuestos orgánicos volátiles y óxidos, y compuestos biogénicos. Otra característica de las partículas es el tamaño, el cual juega un papel importante sobre su depósito a lo largo del tracto respiratorio. Estudios previos han demostrado que el material particulado puede generar asma alérgica en modelos de sensibilización a ovoalbúmina en rata y ratón. Otros estudios han demostrado que los diferentes componentes del PM pueden funcionar como adyuvantes en el proceso de sensibilización. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar los cambios morfo funcionales, inmunológicos y bioquímicos relacionados a la exposición de PM<sub>2.5</sub> en el modelo de sensibilización alérgica de asma en cobayos. Para este estudio, utilizamos 30 cobayos (400-450g). Los animales fueron sensibilizados con una inyección de ovoalbúmina (OVA) + Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante o solo con OVA (*i.p.* e *i.d.*). Además, los animales fueron expuestos a aire filtrado (AF) o PM<sub>2.5</sub> (diariamente, 5h/3 días), utilizando un sistema concentrador de aerosoles localizado en el norte de la Ciudad de México: CINVESTAV-Zacatenco. Evaluamos la función pulmonar mediante pletismografía barométrica para obtener el índice de resistencia

de la vía aérea conocido como PENH después del reto a OVA. Se llevó a cabo la eutanasia de los animales a través de la sobredosis de pentobarbital. Se obtuvo el lavado bronco-alveolar y se determinó el porcentaje de células totales y diferentes tipos de células por la tinción de Giemsa. Además, realizamos ensayos de ELISA para inmunoglobulinas específicas presentes en nuestro modelo de asma tales como IgG1 OVA-específica e IgE OVA-específica y un biomarcador de daño pulmonar como la proteína CC16. Las muestras de pulmón fueron fijadas y extraídas para estudios histológicos mediante la tinción de Masson y PAS. Adicionalmente, realizamos un ensayo Bio-plex para evidenciar la respuesta de tipo Th1/Th2. Por otra parte, evaluamos la actividad de citocromo P540 (CYP450), especialmente de las isoformas CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1. Nuestros resultados mostraron que la exposición a PM2.5 en los animales tratados con OVA + Al(OH)<sub>3</sub> incrementaron el índice de bronco-obstrucción (PENH) y las exacerbaciones, así mismo aumentaron los niveles de las inmunoglobulinas OVA específicas como IgG1 e IgE y el biomarcador de daño pulmonar (CC16) en el líquido bronco-alveolar. Los animales sensibilizados con OVA solamente incrementaron el PENH y la IgG1 e IgE ambas específicas para OVA. El ensayo Bio-plex solo mostró diferencias para IL-12 e INF- $\gamma$ . La matriz de correlación de Pearson para las citocinas Th1/Th2 mostró que algunos pares de proteínas no siguieron cierta tendencia. Este análisis evidenció un interruptor para la respuesta Th1/Th2. Nuestro modelo demostró que la inhalación del PM2.5 podría funcionar como adyuvante, similar al Al(OH)<sub>3</sub> en los animales sensibilizados con OVA solamente. Además, PM2.5 empeoró las exacerbaciones de asma cuando los animales fueron sensibilizados con OVA+Al(OH)<sub>3</sub>. Incluso, la actividad pulmonar del CYP450 disminuyó notablemente, especialmente en las isoformas evaluadas en este estudio como el CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1. Nuestro modelo de asma muestra dos importantes características; la hiperreactividad pulmonar causada por la bronco-obstrucción e inflamación. Ambos eventos pueden modificar la actividad de estos citocromos. Sin embargo, estos resultados demostraron que la composición del PM2.5 es más importante para producir cambios pulmonares.

## 2 Abstract

Asthma is a chronic airway disease characterized by inflammation and reversible obstruction with or without bronchodilators. Around the world over 300 million people presents asthma. However, it has been prognosticated for 2025 it will add 100 million more of patients. This change probably is related to air pollution, since industrialized countries have a high index of allergic diseases. Air pollution represents a serious public health issue around the world, especially in Mexico City as a newly industrialized region, where air pollution problem started since 1980. The traffic is formed by more than 5.5 million of vehicles in this zone. The primary source of particulate matter is the diesel or gasoline combustion of automobiles, bus or trucks. PM contains a big amount of elements such as; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, metals, nonmetals, metalloids and internal transitional elements, volatile organic compounds, and oxides, as well as biological elements. Another feature of PM is the size since can be deposited in the lung. Previous studies have demonstrated that PM can generate allergic asthma using the ovalbumin-sensitization in mouse and rat models. Other studies have found that PM components can function as an adjuvant in the sensitization process. So our aim was to evaluate the morpho-physiological and immunological changes related to PM<sub>2.5</sub> exposures in a sensitization model of allergic asthma in the guinea pig. For this research, we used 30 male guinea pigs (400-450g). Animals were sensitized to ovalbumin (OVA) + Al(OH)<sub>3</sub> as adjuvant or OVA alone (*i.p.* and *s.c.*) and exposed to filtered air (AF) or PM<sub>2.5</sub> (daily 5h/3days), using an Aerosol Concentrator System localized at North of Mexico City: CINVESTAV-Zacatenco. We evaluated the lung function by plethysmography to obtain an airway resistance index (Penh) after OVA challenge. Animals were euthanized with an overdose of pentobarbital. Bronchoalveolar Lavage was performed to determine the percentage different cellular elements by Giemsa-stained, and we did ELISA assay for specific immunoglobulins presents in our asthma model (OVAIgG1 and OVAIgE), and a damage biomarker as CC16 protein. Lung samples were fixative and recovered for histology and stained with Masson and PAS. Also, we did Bio-plex assay for Th1/Th2

response plate. On the other hand, we evaluated CYP450 activity, especially pulmonary CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. Our results showed that the exposure to PM2.5 on animals treated with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> raised bronchoconstriction index called PENH and the exacerbations, as well increased the OVA-IgG1, OVA-IgE and CC16 levels in BAL. Animals sensitized with OVA alone increased Penh and IgG1 and IgE. Bioplex assay only showed differences for IL-12 and INF- $\gamma$ . Our Pearson's correlation matrix demonstrated that some pairs of proteins do not follow a certain tendency. This analysis evidenced a switch Th1/Th2. Our model showed that PM2.5 inhalations could function as adjuvant similar to Al(OH)<sub>3</sub> in animals sensitized with OVA alone. Also, PM2.5 can worsen the asthma exacerbations when animals are sensitized with OVA+Al(OH)<sub>3</sub>. Additionally, pulmonary CYP450 activity decreased in some isoforms in this study as CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. Our asthma model showed two important features; hyperresponsiveness caused by a broncho-obstruction and inflammation. However, these results demonstrated that the composition of PM2.5 is more important for produce pulmonary changes, to decrease these CYP450 isoforms.

## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 Asma

El asma es una enfermedad crónica de incidencia global, cuya prevalencia se ha incrementó notablemente (Huerta-López et al., 2009). Se encuentra definida por sus características clínicas, fisiológicas e histopatológicas. De acuerdo a la organización para la estrategia global del manejo y prevención del asma (GINA), el asma es una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías aéreas y está definida por la presencia de síntomas respiratorios tales como sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho, tos que varía con el tiempo e intensidad, limitando el flujo del aire espirado debido a la bronco-obstrucción de la vía aérea, ya sea por la contracción del músculo liso y/o la producción de moco. A su vez, la limitación del flujo aéreo está asociado a la hiperreactividad (respuesta exagerada frente a un estímulo) de la vía aérea, lo que induce la obstrucción e inflamación de tipo crónico (GINA, 2016). Sin embargo, la bronco obstrucción en el caso del asma puede ser reversible con medicamento y en algunos casos de manera espontánea (GINA, 2016). Los dos signos importantes y que determinan fisiológicamente la patología del asma son el volumen del flujo espiratorio forzado en el primer segundo FEV<sub>1</sub>, y la capacidad vital forzada, FVC. Ambos parámetros se encuentran disminuidos en el asma, debido a que al final de una inspiración completa suelen cerrarse los diferentes elementos del tracto respiratorio en los pacientes asmáticos (West, 2008).

Se estima que alrededor del mundo más de 300 millones de personas sufren esta enfermedad aunque este número varía, ya que entre 0.8%-32.6% de la población mundial padece esta enfermedad de los cuales el 30% son niños y el 10% son adultos (García-Sancho et al., 2012). En México, la prevalencia se encuentra entre el 0.2%-8.6% en una población de adultos jóvenes (22-44 años de edad), siendo más frecuente en áreas urbanas, sin embargo, el número de muertes por



asma en México se ubica en el séptimo lugar a nivel mundial (García-Sancho et al., 2012).

### **3.2 Fisiopatogenia del asma**

Ésta enfermedad, principalmente se manifiesta en los bronquios y bronquiolos pulmonares que son estructuras conductoras del aire, las cuales modifican su estructura histológica a causa de esta enfermedad. Éstos cambios reciben el nombre de “remodelación pulmonar,” ya que se caracterizan por la hipersecreción de moco debida a la hiperplasia de células muco-productoras o metaplasia mucoide, aumento de la capa de músculo liso y de la membrana basal del epitelio respiratorio (Huerta-López et al., 2009). Además, se manifiesta inflamación crónica, que juega un papel importante debido a la gran cantidad de células inflamatorias como son los mastocitos (Barnes, 2008), eosinófilos (Huerta-López et al., 2009), basófilos, linfocitos B y T (Kawakami et al., 2014), células dendríticas (Kuipers et al., 2005). Además, las células epiteliales también participan en el proceso inflamatorio, ya que liberan mediadores químitácticos (Adelman et al., 2005). Aunque en algunos casos los neutrófilos aparecen en el espacio alveolar (Barnes, 2008). Otros componentes importantes son los mediadores inflamatorios producidos por estas células que manifiestan un perfil inmunológico de tipo Th2, y cuyo papel es orquestado por los linfocitos Th2 y la producción de mediadores inflamatorios que resultan en la migración de más células inflamatorias y la estimulación de otros mediadores (Barnes, 2008) (Tabla 1).

Citocinas	Acción	Referencia
<b>IL-4</b>	(Respuesta Th2). Regula la producción de IgE, moco e incrementa la remodelación e hiperreactividad.	Barnes 2001; Kips, 2001; Barnes, 2008
<b>IL-5</b>	(Respuesta Th2). Manutención de la inflamación por eosinófilos, los cuales causan hiperreactividad.	Barnes 2001; Barnes, 2011)
<b>IL-9</b>	(Respuesta Th2). Amplifica la respuesta Th2. Activa a los linfocitos T, IgE y diferencia mastocitos.	(Barnes, 2001; Kips, 2001)
<b>IL-13</b>	(Respuesta Th2). Función similar a IL-4. Incrementa la producción de moco.	(Kips, 2001; Rael et al., 2011)
<b>IL-17</b>	Regula la inflamación por neutrófilos. Induce la secreción de citocinas por otras células.	(Wang et al., 2011)
<b>IL-33</b>	Contribuye a la inflamación tisular por alergia.	(Smith, 2010)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Recluta leucocitos. Estimula la proliferación de las células del mesénquima y del músculo liso.	(Kips, 2001)
<b>GM-CSF</b>	Participa en la maduración de macrófagos e incrementa el número de neutrófilos	(Barnes, 2008)

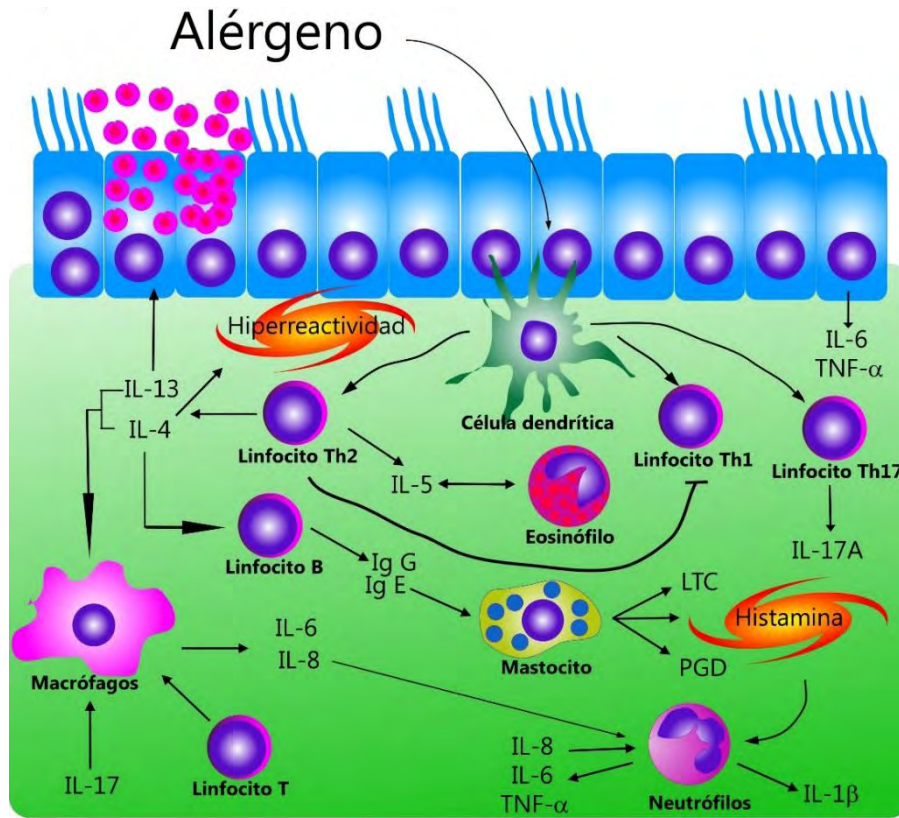
**Tabla 1.** Principales citocinas en la patogénesis del asma.

Además, al ser una enfermedad heterogénea, se reconocen diferentes fenotipos de asma, los cuales están ligados en parte a las características fisiológicas y demográficas. Entre estos tipos podemos mencionar (GINA, 2016):

- **Asma alérgica:** Este tipo es fácilmente reconocible. A menudo comienza en la infancia y está asociado con antecedentes familiares de enfermedades alérgicas como el eczema, rinitis alérgica, alergia a alimentos y medicinas. Presentan un incremento de eosinófilos en esputo.
- **Asma no alérgica:** Algunos adultos presentan asma que no está asociada a alérgenos. El perfil celular en esputo contiene neutrófilos, eosinófilos o puede presentar pocas células inflamatorias.

- **Asma de inicio tardío:** Se observa en adultos que presentan asma por primera vez, y es frecuente en mujeres.
- **Asma con limitación del flujo de aire:** Algunos pacientes con asma de larga duración desarrollan limitación en el flujo de aire fija. Esto es ocasionado por los cambios en el epitelio bronquial y la lámina basal.
- **Asma y obesidad:** Algunos pacientes obesos con asma tiene síntomas respiratorios prominentes y poca inflamación eosinofílica en las vías aéreas.

El asma de tipo alérgica es de mayor importancia a nivel global ya que está asociado a la exposición de alérgenos del medio externo. La respuesta comienza con el reconocimiento de algún antígeno respiratorio a través de las células presentadoras de antígenos (célula dendrítica, linfocito B y/o el macrófago alveolar) Después de este proceso, las células inflamatorias se concentrarán en la vía respiratoria, las cuales producirán diferentes mediadores inflamatorios. El resultado final es el incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y contracción del músculo liso bronquial. Esta reacción se conoce como hipersensibilidad inmediata, o de tipo I o atópica (asociado a IgE o IgG) porque comienza a los pocos minutos después de la exposición del antígeno (Abbas, 2012) (Figura 1). Esta serie de reacciones comparten la misma activación y respuesta en todas las enfermedades alérgicas. Sin embargo, esta respuesta inmunológica puede ser bloqueada por la activación de la respuesta Th1, la cual muestra una serie de citocinas que inhiben a la respuesta alérgica (Th2) como son IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ , principalmente (Tabla 2).



**Figura 1.** Asma alérgica. Mecanismo de activación después del contacto con algún alérgeno sobre la vía respiratoria. El resultado es la respuesta de hipersensibilidad de tipo I o atópica en animales o humanos asmáticos.

Citocinas	Acción	Referencia
<b>IL-2</b>	(Th1) Crecimiento y diferenciación de linfocitos T, promueve la eosinofilia <i>in vivo</i> .	(Chung et al., 1999)
<b>IL-12</b>	Potente inductor de INF- $\gamma$ a partir de los linfocitos T y NK y de otros tipos celulares y ha demostrado ser un potente inductor de la diferenciación de los linfocitos Th1.	(Trinchieri et al., 2003)
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	(Th1) inhibe la liberación de eosinófilos después del contacto con el alérgeno. Bloquea la producción de células Th2 y activa a las células endoteliales, epiteliales, macrófagos alveolares y monocitos. Disminuye las inmunoglobulinas en general.	(Chung et al., 1999)

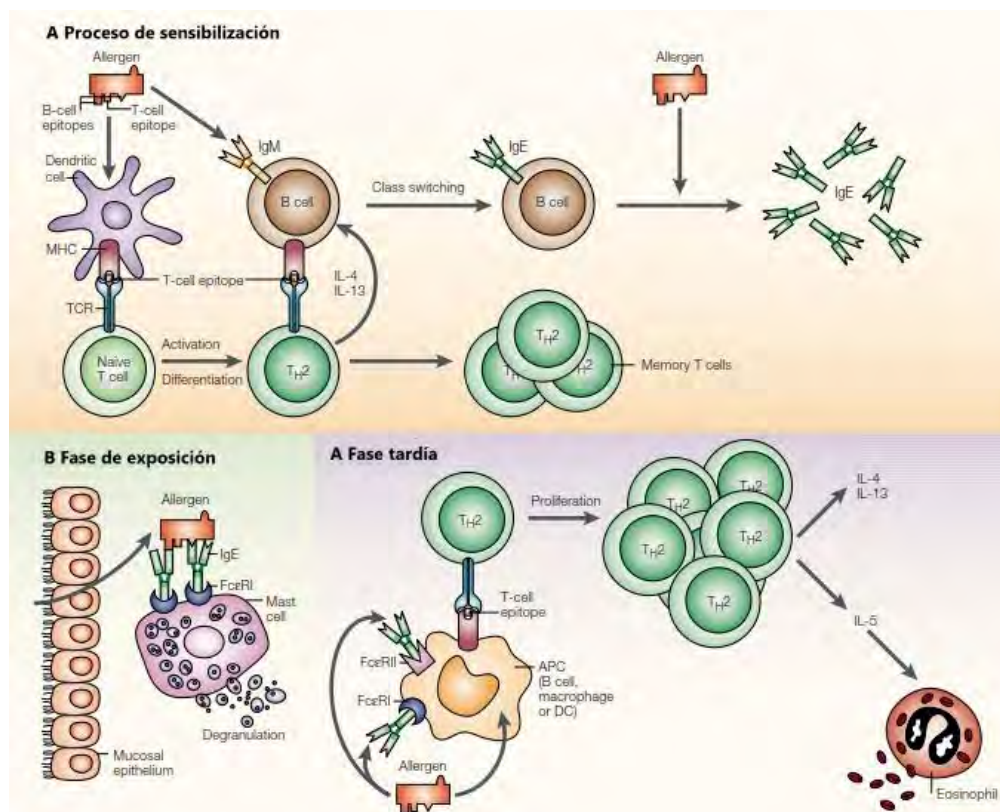
**Tabla 2.** Principales citocinas de la respuesta Th1.

### 3.3 Reacción inmunitaria dependiente de inmunoglobulinas

Como se mencionó anteriormente, la principal característica de las enfermedades alérgicas es la activación de los linfocitos Th2 y la producción de anticuerpos IgE (Abbas, 2012) en humanos e IgG en animales (Williams et al., 2012). La producción de inmunoglobulinas en las alergias, principalmente en el asma, comienza con el reconocimiento del antígeno por parte de las células presentadoras de antígenos, ya sea por las células dendríticas y/o el linfocito B. Ambos co-estimulan la diferenciación de los linfocitos T vírgenes para generar linfocitos Th2 (CD4+), y los linfocitos B (CD25) para su transformación a células plasmáticas, es decir, las células que producirán inmunoglobulinas (IgE o IgG) específicas para este alérgeno. Una vez producidas las IgG o IgE producidas según sea el caso, se unirán a la membrana de los mastocitos (Abbas, 2012) a través de sus receptores de alta afinidad (FcεRI) para IgE (Chung et al., 1999) o FcγRI para IgG (Mora y Rosales, 2009). En el caso de los macrófagos, las IgE se pueden unir a través de los receptores para IgE de baja afinidad (FcεRII) (P. Barnes, 2007). Esta primera etapa se conoce como **fase de sensibilización**. En la segunda exposición, el alérgeno se unirá a las IgE o IgG, que están acoplados a sus respectivos receptores Fc del mastocito (también llamada célula cebada) liberará diferentes mediadores tal como citocinas, leucotrienos, prostaglandinas e histamina (Tabla 3). La fase tardía de exposición al antígeno tiene como consecuencia la interacción de los linfocitos Th2 y las células presentadoras de antígenos que reconocen al antígeno tanto en las IgE o IgG adheridas a sus receptores FcεRI o FcγRI. Este reconocimiento estimula la proliferación de más linfocitos Th2 para que sinteticen más IL-4, IL-13 e IL-5. Ésta última interleucina incrementa el número de eosinófilos en el pulmón (Abbas, 2012) (Figura 2). Además, la producción de linfocitos Th2 inhibe la respuesta Th1.

Mediadores	Acción	Referencia
<b>PGD2 (Prostaglandina D2)</b>	Vasodilatación, broncoconstricción y quimiotaxis de neutrófilos.	(Abbas, 2012)
<b>LTC4 (Leucotrieno C4)</b>	Aumento de la hiperreactividad pulmonar. Broncoconstricción prolongada, secreción de moco, aumento de la permeabilidad vascular.	(Barnes, 2007; Abbas, 2012)
<b>LTD4 (Leucotrieno D4)</b>		
<b>LTE4 (Leucotrieno E4)</b>		
<b>Histamina</b>	Contracciones endoteliales, aumento de la permeabilidad vascular, constricción del músculo liso bronquial.	(Abbas, 2012)

**Tabla 3.** Mediadores liberados por la célula plasmática.



**Figura 2.** A) Procesos de sensibilización. El alérgeno es reconocido por la célula dendrítica y el linfocito B. B) Fase de exposición, durante un segundo reto antigénico, el antígeno se unirá a las inmunoglobulinas. Este anclaje producirá la liberación de los componentes del mastocito. C)

Fase tardía de la exposición al antígeno. El resultado es la estimulación y proliferación de más linfocitos Th2 y la síntesis de más IL-4, IL-13 e IL-5. Modificado de (Valenta, 2002).

Para que se lleve a cabo la serie de respuestas inmunológicas como la respuesta de tipo Th2 en los modelos de alergia, el antígeno siempre es administrado con algún adyuvante como es el caso de algunos compuestos del aluminio, que son los adyuvantes más usado en la inmunoterapia alérgica y vacunación.

### **3.4 Los adyuvantes en los modelos de sensibilización alérgicas**

Aproximadamente, el 75% de todos los adyuvantes están basados en sales de aluminio y el uso de éstos se ha utilizado en vacunación por más de 80 años (Exley, 2014). La absorción del adyuvante aún es considerada como un mecanismo importante, ya que los antígenos solubles pueden ser presentados a las células presentadoras de antígenos como “partículas”, de esta manera se facilita el reconocimiento por parte de este tipo celular. La administración de este compuesto en cobayos induce la liberación de factores solubles secretados por los macrófagos, los cuales estimulan la producción de factores quimio atrayentes de eosinófilos y linfocitos, además mejora la retención de los linfocitos en los nódulos linfoides, incrementa la proliferación de linfocitos T y su diferenciación a la subpoblación de linfocitos Th2 cuando los animales están inmunizados con algún antígeno. Igualmente, tiene la capacidad de estimular la producción de inmunoglobulinas IgE e IgG con la reacción del perfil Th2 en ratones y de la subclase de IgG1 e IgG2 (Lindblad, 2004). Por otro lado, hay una fuerte evidencia sobre los efectos pro-inflamatorios de la exposición crónica de estos compuestos, ya que fomentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Los compuestos de aluminio son excelentes pro-oxidantes y promueven este evento en el sitio de inyección y cuando son combinados con hierro reducen el Fe (III) a Fe (II) y promueven la auto oxidación del primero, por lo tanto potencian la formación de ROS, además promueven la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Exley et al., 2010a). Por

otro lado, el pulmón cuenta con una serie de proteínas las cuales pueden producir ROS como el sistema de detoxificación llamado CYP450 y otra proteína conocida como CC16 cuya respuesta es alterada por el estrés oxidante.

### **3.5 Proteína CC16**

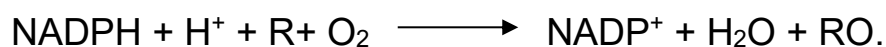
La célula de Club antes llamada célula de Clara en honor al investigador Alemán Max Clara (1937), secreta una serie de proteínas como la proteína surfactante de tipo A y D, que mantienen cierta permeabilidad en el parénquima pulmonar (Bolton et al., 2008; Falcón Rodríguez, 2012). Además, secretan otra proteína cuya importancia ha aumentado en los últimos años ya que muestra una diversidad de marcadores de sí misma, esta proteína se llama secretoglobina (SCGB1A1), la cual permite la diferenciación de las células Club en los bronquiolos pulmonares (Reynolds et al., 2010; Falcón Rodríguez, 2012). Esta proteína presenta una gran cantidad de nombres, para humanos y ratón a menudo se utiliza el nombre de CCSP (Club Cell Secretory Protein) o CC10 para ratones y ratas (Reynolds et al., 2010); y CC16 utilizado en otras especies como los cobayos (Bolton et al., 2008). Aunque cualquier nombre hace referencia a la misma proteína (Reynolds et al., 2010). CC16 es un esteroide inducible que muestra cierto grado de homología con la globina de útero en conejo (Stripp et al., 1992). Su función principal es regular la respuesta inmune e inflamación dentro de pulmón regulando la liberación de mediadores proinflamatorios como leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (Wang et al., 2003), además juega un papel importante como antioxidante (Zhao et al., 2014; Falcón Rodríguez, 2012). Debido a que la proteína CC16 se encuentra en el suero se ha utilizado como un marcador sensitivo el cual puede evidenciar la permeabilidad del epitelio pulmonar, daño respiratorio agudo y desordenes pulmonares crónicos en animales y humanos (Zhao et al., 2014). En el caso de algunas patologías como la fibrosis o el asma esta proteína disminuye sus niveles en el suero mientras que la neumonía intersticial idiopática eleva los niveles de esta proteína en líquido bronco alveolar (BAL) (Vanspauwen et al., 2009).



### 3.6 Sistema metabólico de xenobioticos en el pulmón

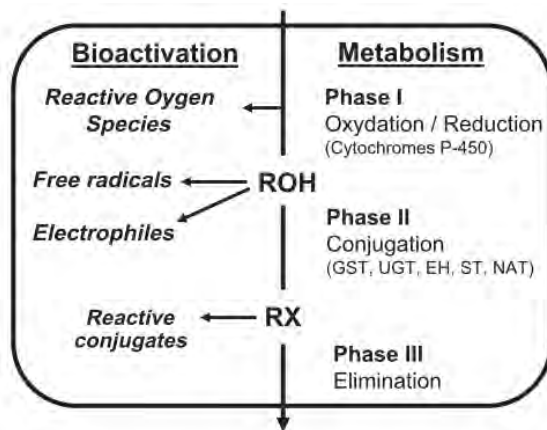
El citocromo P450 (CYP) es un grupo de hemoproteínas que contienen hierro y exhiben un máximo de absorción a 450 nm. Son las primeras enzimas en reaccionar en la oxidación de fármacos, carcinógenos y esteroides (Guengerich, 2003). Son un grupo de enzimas que contienen sustratos inespecíficos y se encuentran en mayor cantidad dentro de la célula, además son los más estudiados (Gómez-Lechón et al., 2001; Falcón Rodríguez, 2012).

En los mamíferos todos los CYP's se encuentran ubicados en retículo endoplásmico liso, pero solo cinco familias se encuentran en las mitocondrias. Estos últimos obtienen los electrones de la cadena respiratoria mientras que los primeros interactúan con los electrones provenientes de la flavoproteína NADPH-P450 reductasa, necesaria para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción (Guengerich, 2003). A partir de una serie de reacciones se solubilizan los compuestos extraños y puede inactivarlos, de esta manera es más fácil eliminarlos (Guengerich et al., 1991; Falcón Rodríguez, 2012). Usan un par de átomos de oxígeno, y solo uno de estos es incorporado en la molécula sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua permitiendo la siguiente reacción (Guengerich, 2003):



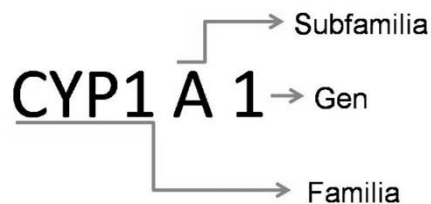
R: Sustrato; RO: Producto

Todas estas enzimas funcionan en la fase uno del metabolismo de xenobioticos y su función principal es llevar a cabo reacciones de óxido-reducción para después conjugarlos y así eliminarlos del cuerpo (Figura 3).



**Figura 3.** Metabolismo y bioactivación de compuestos. Fase 1 reacciones de óxido-reducción, en las que interviene el CYP450. Fase 2. Reacciones de conjugación y la Fase 3, eliminación de sustancias a través de orina, heces o transpiración. Tomado de (Gómez-Lechón et al., 2001).

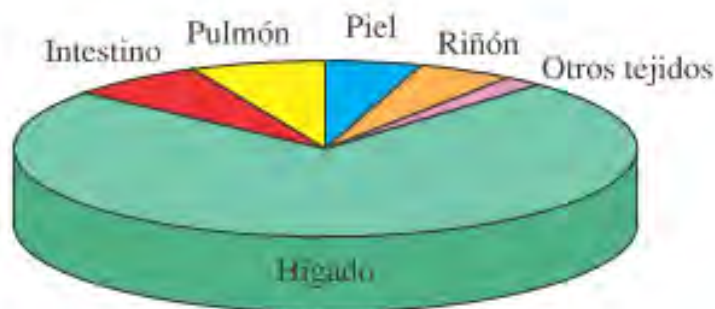
Este sistema de enzimas cuenta con aproximadamente 200 familias de CYP y 2000 isoformas, cada subfamilia está formada por proteínas que comparten más del 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos y cada familia comparte más del 55%. De esta manera, se usan letras de la A-E, para designar la subfamilia y número arábigo para indicar el gen individual que ordena la síntesis (Repetto et al., 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Nomenclatura de los CYP, Ejemplo de la nomenclatura del CYP1A1. Tomado de (Falcón Rodríguez, 2012).

Los principales metabolizadores de xenobióticos se incluyen en tres familias: CYP 1, 2 y 3. Dentro de estas tres familias encontramos diferentes isoformas. Todas estas isoformas presentan gran versatilidad funcional, ya que pueden catalizar un elevado número de sustratos (Castell et al., 2005). Aunque el hígado es el órgano

que posee mayor nivel de expresión de citocromo P450 (CYP) y es el más activo en el metabolismo de moléculas exógenas y endógenas (Gómez-Lechón et al., 2001), el pulmón constituye el segundo sitio de metabolismo de xenobióticos, el cual posee la capacidad potencial de biotransformación de los contaminantes ambientales inhalados (Falcón Rodríguez, 2012). (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión de los CYP en diferentes tejidos. Tomado de (Gómez-Lechón et al., 2001).

Los cobayos a diferencia de los roedores presentan una cantidad de menor de CYP450 y las isoformas que destacan en este modelo animal son CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP3A14, CYP3A15, CYP4A13, IIB2, IIB1 y IIB17 (Cox, 2016), sin embargo, las principales isoformas relacionadas con la contaminación ambiental son CYP1A1 y CYP1A2, ya que depende del receptor de hidrocarburos aromáticos (AHR, por sus siglas en inglés) (Ioannides, 2008). Además, la expresión del CYP2E1 pueden ser afectada en respuesta a xenobióticos, condiciones patofisiológicas, desórdenes nutricionales e inflamación (Cox, 2016).

### 3.7 Contaminación atmosférica

Se define como la presencia de sustancias en el aire que en cantidades altas pueden ser perjudiciales para la vida, además afecta a las estructuras, materiales y ocasiona cambios en las condiciones meteorológicas y climáticas. La mayoría de las emisiones son producidas por la actividad natural o antropogénica (Falcón Rodríguez, 2012; Vallejo et al., 2003). Un contaminante atmosférico es cualquier

sustancia química o biológica que al agregarse al aire puede modificar las características naturales del ambiente. Entre ellos podemos encontrar a humos, polvos, gases, cenizas y biológicos (Falcón Rodríguez, 2012; Vallejo et al., 2003).

### **3.7.1 La contaminación en la Ciudad de México**

La Ciudad de México se encuentra ubicada en una cuenca a 2240 metros sobre el nivel del mar (msnm). La superficie total corresponde a 1499 km<sup>2</sup> (INEGI, 2013b), la cual alberga una población de 9 millones de habitantes y una flota vehicular de 5.5 millones. Si sumamos la Zona Metropolitana de la ciudad de México (ZMCM), el número de habitantes incrementa a más de 22 millones y el número de vehículos automotores se eleva a 8.7 millones ( $\Sigma$  del censo poblacional 2014) (INEGI, 2013a). Además, la zona norte de la Ciudad presenta gran carga de emisiones de tipo industrial. Debido al elevado número de habitantes, industria y vehículos, la Ciudad de México es considerada una mega-ciudad. Uno de sus principales problemas, desde 1980, es la contaminación ambiental, sin embargo, en los últimos años, este problema se ha agudizado por los factores climáticos presentes y la pésima combustión de las gasolinas y diésel debido a las bajas concentraciones de oxígeno (Falcón Rodríguez, 2012; Vallejo et al., 2003).

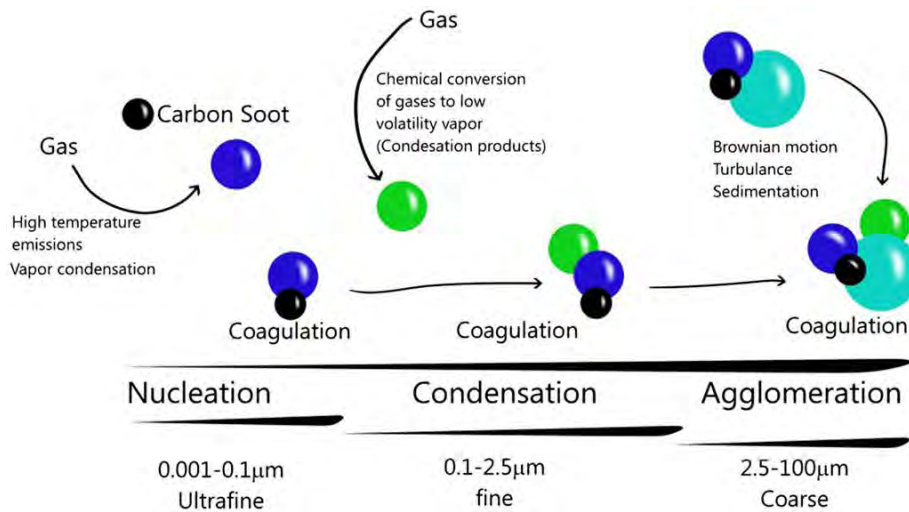
En todas las ciudades del mundo, y en la Ciudad de México, es posible encontrar concentraciones elevadas de ciertos contaminantes llamados contaminantes criterio, debido a la capacidad para reducir o producir daños a la salud como son: dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles COV, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), ozono (O<sub>3</sub>) y material particulado (PM, por sus siglas en inglés). Este último ha cobrado gran interés en los últimos años debido a su naturaleza química y composición.

### 3.7.2 El material particulado

El PM es una mezcla de partículas sólidas y/o líquidas suspendidas en el aire las cuales pueden alojarse en el tracto respiratorio a diferencia de los gases que suelen difundirse rápidamente a través de este sistema (Falcon-Rodriguez et al., 2016). El PM tiene su origen a partir de fuentes naturales y antropogénicas. Los procesos naturales que tiene lugar en el planeta emiten partículas a la atmósfera y ellos incluyen a los sprays del mar generados durante el oleaje (Seinfeld et al., 2012), las erupciones volcánicas, incendios forestales espontáneos y la erosión del suelo (Vega et al., 2011). Por otra parte, la actividad humana es la principal causa de emisión de estas partículas e incluyen a la industria minera, metalúrgica, eléctrica, manufacturera y construcción (Pérez-Vidal et al., 2010), además de la quema de cualquier tipo de combustible sea madera o gas (Edgerton et al., 1999), aceites, diésel y gasolinas (Ulrich et al., 2012) por parte de las diferentes formas de transporte en las ciudades.

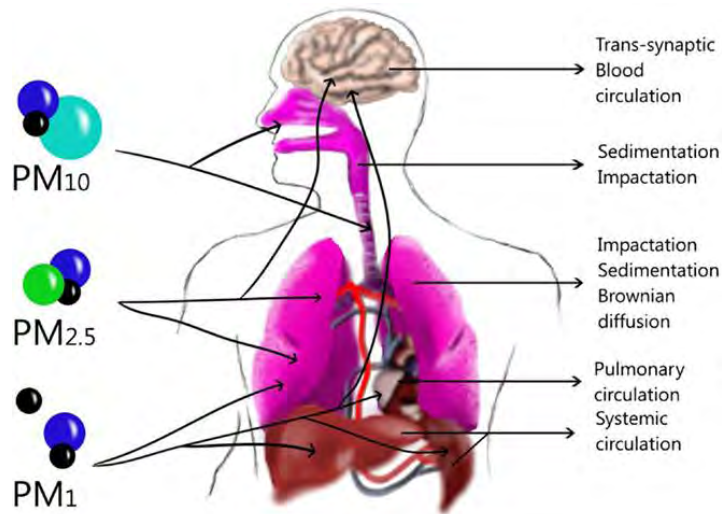
En la atmósfera se encuentran dos tipos de partículas. Por un lado, están presentes las partículas que se emiten directamente y las que se forman en la atmósfera. Las primeras se les conocen como partículas primarias mientras que las segundas son nombradas como partículas secundarias, ya que son gases transformados a sólidos en la atmósfera. Ambas partículas presentan interacciones en la atmósfera y pueden incrementar su tamaño y contenido dependiendo de las condiciones climáticas. El primer paso para la generación de nuevas partículas es el proceso de nucleación y depende de la conversión de un gas al estado sólido mediante la condensación o reacciones químicas en la atmósfera. El segundo paso es la condensación, que es similar a la nucleación. La última etapa es la aglomeración, aunque también puede llevarse a cabo entre la fase de nucleación-condensación. Esta etapa tiene como resultado la adsorción de las partículas a través de movimientos brownianos, turbulencias, y contacto entre partículas (Falcon-Rodriguez et al., 2016; Phalen et al., 2013) (Figura 6). De esta manera las partículas pueden incrementar su tamaño.

El tamaño es una característica importante, pues de acuerdo a éste se depositarán en las diferentes regiones del tracto respiratorio. Las PM10 cuyo diámetro aerodinámico es menor o igual de  $10\mu\text{m}$  se alojarán en las vías aéreas superiores, mientras que las PM2.5 ( $\leq 2.5\mu\text{m}$ ) llegan a bronquiolo y alveolos y allí se depositarán.



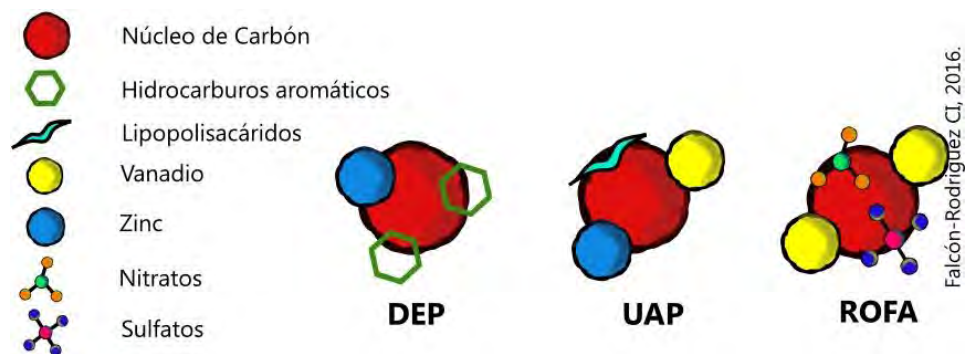
**Figura 6.** Material particulado y su dinámica atmosférica. Tomado de (Falcon-Rodriguez et al., 2016).

En cambio, las partículas ultrafinas (UFP, por sus siglas en inglés) pueden atravesar la barrera hematogaseosa, traslocándose a otros órganos por vía sistémica (Nemmar et al., 2013). En las diferentes regiones del aparato respiratorio, las partículas pueden depositarse a través de diversos fenómenos como el movimiento browniano (Kim et al., 2002), la sedimentación, impacto, difusión o por cargas eléctricas (Phalen et al., 2013) (Figura 7).



**Figura 7.** Sitios principales de la acumulación de material particulado en relación con su tamaño. Tomado de Falcon-Rodriguez et al., 2016.

Además del tamaño, la composición es otra característica importante y también es el resultado de la dinámica atmosférica. En el ambiente se determinaron diferentes tipos de partículas que de acuerdo a su contenido se han clasificado como: Partículas de emisión de diésel (DEP por sus siglas en inglés), formados principalmente por PAHs, y metales como el Zinc (Bonner, 2007). Las partículas del valle de Utah (UAP por sus siglas en inglés) se encuentran en cualquier ciudad del mundo y están formadas principalmente por metales como el vanadio y zinc, además de lipopolisacáridos (Bonner, 2007). Por último, encontramos a las partículas de residuos de combustibles (ROFA, por sus siglas en inglés), las cuales están formadas básicamente por metales (Bonner, 2007) sulfatos, nitratos (Vega et al., 2011) y vanadio (Bonner, 2007) (Figura 8).



**Figura 8.** Tipos de partículas que se encuentran en la atmosfera de las ciudades del mundo. Modificado de Falcón-Rodríguez, 2012.

Además, en el material particulado se adsorben (unión líquido-sólido o sólido-sólido) otros elementos, como metales, metales de transición, no metales, PAHs, biológicos, carbón entre otros (Tabla 4). Toda esta mezcla es capaz de producir alteraciones pulmonares, especialmente en algunas patologías restrictivas y/u obstructivas como el asma alérgica.

Composición	Elementos	Referencias
<b>Metales</b>	K, Ca, Ga, Pb, Sr, Zr, Ba, Na, Li, Be, Ti, Sn, Mg Al, Cs, Bi, In, Sb	(Osornio-Vargas et al., 2003; Garimella et al., 2007 ; Steerenberg et al., 2006; Schwander et al., 2014)
<b>Metales de transición</b>	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Au, V, Hg, Nb, Tl, Co, Mo, Zr, Rb, Ag	(Osornio-Vargas et al., 2003; Steerenberg et al., 2006; Schwander et al., 2014; Dergham et al., 2015)
<b>Metaloides</b>	Si	(Limbeck et al., 2009)
<b>No metales</b>	B, As, Se, S, Sb	(Steerenberg et al., 2006; Schwander et al., 2014)
<b>Elementos de Transición Interna</b>	Sm, U, Tb, Ce, La	(Steerenberg et al., 2006; Schwander et al., 2014; Dergham et al., 2015)



<b>Aerobiológicos</b>	Algas, Glucano, Endotoxinas, Polen, Virus	(Alves et al., 2014) (Harrison et al., 2000; Nemmar et al., 2013)
<b>Carbón</b>	Elemental Orgánico	(Mugica et al., 2009)
<b>PAH's</b>	(Nap) naftaleno, (AcPy): acenaftileno, (Flu) fluoreno, (Phe) fenantreno, (Ant) antraceno, (Flenley) fluorantreno, pireno, (BaA) benzo[a] antraceno, (Chr) criseno, (BaFL) benzo[b] fluorantreno, (BkFL) benzo[k] fluorantreno, (BaP) benzo[a]pireno, (InP) indeno[cd]pireno, dibenzo[ah]antraceno, (BghiP): benzo[ghi]perileno, (BaP-TEQs) Benzo[a]Pireno-tóxico	(Dergham et al., 2015)
<b>Otros</b>	Sulfato de amonio y nitratos  Paraformaldheido	(Bonner, 2007; Calderon- Garciduenas et al., 2007; Vega et al., 2011)

**Tabla 4.** Composición del material particulado.

## 4 ANTECEDENTES

En los últimos 40 años, la prevalencia de enfermedades alérgicas se incrementó del 4 al 20% en Estados Unidos, Reino Unido y Japón (Steerenberg et al., 1999). Dentro de los tipos de alergias más frecuente encontramos desordenes eosinofílicos, como esofagitis, alergia a medicamentos, insectos, alimentos, así como, anafilaxia, rinitis, conjuntivas, angioedema, urticaria, eczema y asma (Pawankar, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) estima que más de 300 millones de personas en el mundo sufren de asma. Sin embargo, para 2025 se pronostica el incremento del 49 al 59% (Bousquet et al., 2005) esto significa que se sumaran 100 millones de personas más en todo el mundo (Bousquet et al., 2005; Pawankar et al., 2012). En México, el Estudio ISAAC (The International Study of Asthma and allergies in Childhood), demostró que la prevalencia de enfermedades alérgicas incrementó (Pérez et al., 2009), especialmente en el caso del asma, ya que reportan alrededor de 30 casos nuevos por mes (Vargas, 2009).

El incremento en las enfermedades alérgicas, especialmente del asma, podría estar asociado a la contaminación ambiental, como ocurre en países industrializados, los cuales presentan alto índice de estas enfermedades (Takizawa, 2011). En estas zonas el número de motores a diésel está asociado a la emisión de DEP, los cuales se han correlacionado con síntomas clínicos en sujetos sensibilizados. Además, se conoce el potencial adyuvante de las DEP cuando se co-administran con alérgenos (Diaz-Sanchez et al., 1999), así como la respuesta alérgica e inflamatoria en exposiciones agudas (Riedl, 2008). Sin embargo, el estudio del PM aún no muestra consistencias epidemiológicas.

## 4.1 Contaminación y Asma

Los estudios epidemiológicos han tratado de evidenciar el desarrollo de enfermedades atópicas con la ayuda de bases de datos y meta-análisis (Ofstedal et al., 2007) o sensibilización en humanos voluntarios expuestos a PM (Gruzieva et al., 2014). Sin embargo, cada estudio muestra diferentes resultados que presentan controversia debido a las limitaciones de las series de evaluaciones realizadas en éstos análisis, como la situación geográfica, sexo, historia atópica de cada persona, cambio de residencia, número de pacientes, etc.

El estudio BAMSE (Children, Allergy, Milieu, Stockholm, Epidemiological Survey) en Oslo, evaluó los niveles moderados de contaminación atmosférica local emitida por el tráfico vehicular, especialmente de óxidos de nitrógeno y PM10. Estudiaron el desarrollo de enfermedades pulmonares y sensibilización en niños de 4 años (Nordling et al., 2008). Es decir, la infancia está relacionada con el proceso de sensibilización contra ciertos antígenos que muestran patrones diferentes entre niños de 4 y 8 años, mientras que no se encontró asociación entre la contaminación y la sensibilización a la edad de 9-10 años en esta cohorte (Krämer et al., 2000; Gruzieva et al., 2012). Resultados similares fueron reportados en el estudio PIAMA (Dutch Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy). Solo que difirió en la evaluación de PM2.5 y no PM10. Las conclusiones demostraron que la exposición a contaminación producida por tráfico vehicular podría causar asma en niños desde 0 a 8 años de edad (Gehring et al., 2010).

En otro estudio llamado ESCAPE (European Collaborative European Study of Cohorts for Air Pollution Effects) el cual incluyó a niños (8-10 años), no evidenció asociación entre estos dos eventos, especialmente en los niños de Oslo (Gruzieva et al., 2014). Así mismo, la exposición crónica a contaminantes relacionado al tráfico vehicular no se asoció con el proceso de sensibilización en niños 9-10 años de edad también de Oslo. Sin embargo, fue asociado a la exposición del ácaro del polvo

(*Dermatofagoides farinae*) y del gato, el cual podría explicar las condiciones socioeconómicas familiares de los niños (Ofstedal et al., 2007). Los dos estudios anteriores a diferencia del estudio BAMSE no muestran asociaciones (Gruzieva et al., 2014). Aunque la posible explicación podría estar relacionada con los bajos niveles de contaminación en Oslo (Ofstedal et al., 2007). Otra posible explicación es la edad de los niños, ya que el estudio BAMSE encontró resultados hasta los 8 años de edad y no en niños mayores de 9 años.

En el estudio llamado SAPALDIA (Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults), evaluaron la relación de residir cerca de una vía de autos principal (< 200m de distancia) con los síntomas respiratorios (datos de SALPALDIA 1 y 2). Se reportó que, las personas que viven cerca de las vías muy transitadas presentan síntomas como falta de aire, producción de esputo y sibilancias. Este fue el primer estudio que documenta los efectos adversos de la contaminación atmosférica generados por el tráfico en una población adulta sin patologías pulmonares previas (SALPALDIA, 2008). Además, las diferentes colaboraciones con el estudio de SALPALDIA han encontrado hallazgos relevantes. La unidad de inmunoterapia experimental del hospital universitario de Zurich apoyó la hipótesis del proceso de sensibilización en los primeros meses de nacido al inhalar elementos que predisponen al desarrollo de enfermedades respiratorias atópicas. Además, en colaboración con el Centro de Investigación y Epidemiología en Barcelona se abordó la cuestión sobre la aparición de asma *de novo* en adultos relacionado a la contaminación del aire por el tráfico vehicular (SALPALDIA, 2008). Asimismo, la contaminación asociada al tráfico vehicular ha sido asociada con el incremento de eosinófilos y de la respuesta inmunológica con el perfil Th2 en niños asmáticos (Rosser et al., 2016).

Por otro lado, en Japón, Yamazaki et al (2013)., lograron relacionar los índices altos de contaminación, especialmente de ozono y no de PM10 con el número de urgencias hospitalarias en horario de 9 pm a 6 am en la ciudad de Himeji, en Japón. Una limitación del estudio fue el número de pacientes asmáticos y la

selección de ellos (Yamazaki et al., 2013). Además, en otra asociación en niños de Francia, se demostró que la exposición de PM2.5 incrementa la respuesta inflamatoria dentro de pulmón, específicamente de eosinófilos más que la exposición a PM10 (Nikasinovic et al., 2006). Una serie de estudios llevados a cabo en Europa tales como en Países Bajos midieron los niveles de la proteína CC16 en suero de pasajeros de camiones, conductores y ciclistas, sin embargo, a pesar de la gran cantidad de partículas (alrededor de 25 000 /cm<sup>3</sup>) los niveles de CC16 y otros mediadores inflamatorios presentaron fuertes inconsistencias (Zuurbier et al., 2011). Además, se asociaron las concentraciones de CC16 en orina y la variación de partículas ultra finas en voluntarios residentes de Ámsterdam en Países Bajos, Erfurt en Alemania y Helsinki en Finlandia. La concentración de partículas fue monitoreada en una central de cada país, la media en 24h de estas partículas fue en cada ciudad de: 17.3×10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> en Ámsterdam, 21.1×10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> en Erfurt, and 17.0×10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> en Helsinki, las concentraciones de PM2.5 fueron de 20, 23 y 13 µg/m<sup>3</sup>, respectivamente. En contraste las concentraciones de CC16 parecieron incrementar conforme los niveles de PM2.5 incrementaron en Helsinki, especialmente entre las personas con alguna enfermedad respiratoria, produciendo el incremento en la permeabilidad de la barrera epitelial (Timonen et al., 2004).

Las inconsistencias mostradas en los estudios epidemiológicos, probablemente están relacionadas con la evaluación del PM10 y PM2.5 como activadores de alergias en humanos. En la literatura científica, existen pocos estudios evaluando esta hipótesis (Li et al., 2010). Sin embargo, en los modelos animales de sensibilización alérgica la información es más concluyente.

## 4.2 Estudios en el modelo animal de sensibilización

En el modelo de sensibilización de asma alérgica se utilizan frecuentemente a los roedores, principalmente rata y ratón. Dicho proceso comienza con la sensibilización específicamente de una mezcla de ovoalbúmina (OVA) más un adyuvante en periodos y dosis específicas de cada autor.

En ratas Brown Norway, las cuales fueron sensibilizadas por vía intranasal o intratraqueal al polen de pasto (*Phleum pratense*) más 3mg/mL de DEP, los resultados evidenciaron que produce reacciones inflamatorias dentro del pulmón con incremento de la IgE específica para este polen (Steerenberg et al., 1999). En ratones BALB/c, se evaluó la administración intranasal de la mezcla OVA (10 $\mu$ g) más UFP o PM2.5 (0.5 $\mu$ g) en suspensión en solución fisiológica. Los resultados demostraron que el efecto adyuvante es potente en la mezcla OVA + UFP, pero no usando PM2.5 (Li et al., 2009). En otro estudio del mismo grupo de investigación, demostraron que la administración intranasal de la mezcla de OVA (10 $\mu$ g) y UFP (0.5 $\mu$ g), funcionó como adyuvante debido a su composición y alto poder óxido-reductor. Asimismo, incrementó varios productos celulares de la respuesta Th2 (IL-5, IL-13, OVA-específica IgG1 e IgE) e IL-17. Asimismo, incrementó el número de neutrófilos y eosinófilos (Li et al., 2010).

Además, la inhalación de humos u ozono incrementa la permeabilidad (Van Miert et al., 2005) la cual se ha evaluado utilizando la proteína CC16 a través de diferentes ensayos y en diferentes muestras como BAL, orina y suero. La inhalación de metales modificó la proteína CC16, tal como sucedió con la inhalación de vanadio que incrementó correlativamente esta proteína evaluada a través de inmunohistoquímica en el epitelio bronquiolar después de 8 semanas de exposición. El análisis se realizó a las 0, 4, 6 y 8 semanas de exposición, las cuales mostraron una  $r = 0.9955$  y una  $r^2 = 0.9909$ , evidenciando que la proteína CC16 aumenta conforme incrementa el tiempo de exposición (Falcón Rodríguez, 2012). El humo de cigarro, el cual inhalaban a diferentes tiempos (2, 4, 15 y 24 h) y diferentes

concentraciones (0, 250, 500, 750, 1000 y 1250 g total) ratas de la cepa Sprague Dawley también mostró un incremento en concentración-dependiente y tiempo dependiente marcado de la proteína CC16 evaluada en el BALF (Van Miert et al., 2005). En la cepa BALB/c de ratones los niveles de la proteína CC16 disminuyeron después del primer día de exposición, sin embargo, incrementaron después de 7 días en animales sensibilizados a OVA y en animales sensibilizados que inhalaban partículas ultra finas los niveles incrementaron aún más. La expresión de la proteína CC16 aumentó junto con la TNF- $\alpha$  (Alessandrini et al., 2010). En el modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR/NHsd) la instilación de partículas ultra finas no produjo liberación de la proteína CC16, lo que indicó que la exposición relativa a altas concentraciones instiladas de estas partículas no causan efecto tóxico serio (Gerlofs-Nijland et al., 2005). En otro estudio en el cual instilaron PM2.5 en ratas jóvenes Wistar de cuatro ciudades europeas de diferentes temporadas climáticas se produjo incremento de los niveles de CC16 en la temporada de primavera, invierno y otoño principalmente en las cuatro ciudades evaluadas (Ámsterdam, Oslo, Romo y Lodz), en contraste la fracción gruesa PM10 incrementó en todas las ciudades y temporadas más que la fracción anterior, produciendo un efecto de daño y permeabilidad mayor (Halatek et al., 2011).

De manera interesante, el análisis de composición de las partículas en un estudio realizado en cinco ciudades europeas demostró daño y el efecto adyuvante en el proceso de sensibilización, no solo asociado al tamaño sino también a la región geográfica en donde se colectaron las partículas (Steerenberg et al., 2005). Ellos sensibilizaron a ratones BALB/c por la vía intra-nasal con una mezcla de OVA (0.4mg/mL) plus PM (9 mg/mL), el cual resultó en una dosis de 20mg de ovoalbúmina por ratón y 450mg de PM, debido a las repetidas administraciones del proceso de sensibilización. El PM fue colectado de cinco ciudades europeas (Ámsterdam, Roma, Lodz, Oslo y Zilk) y se evaluaron diferentes biomarcadores del proceso de sensibilización (IgE, IgG1, IgG2a, específicas para OVA). Los resultados mostraron que el PM de dos ciudades tiene alto poder adyuvante. Para Roma, la fracción PM10 y Lodz para PM2.5, ambos en primavera. Y la muestra de Oslo de

PM10 presentó un pico en dicha actividad. Ellos atribuyeron la actividad adyuvante a la fracción soluble de las partículas, ya que, la fracción insoluble de las muestras de Oslo y Roma no modificó los niveles de las inmunoglobulinas y no mostró cambios patológicos, mientras que en la fracción soluble de Lodz (primavera) activó estos cambios en los lavados bronco-alveolares (BAL, pos sus siglas en inglés) (Steerenberg et al., 2005). En un estudio posterior, analizaron el contenido de las diferentes muestras de las cinco ciudades. En el caso del análisis de elemental de componentes, se encontró que Roma tiene todos los mismos metales a excepción del zinc (Möbs et al.). En cambio, las muestras de Ámsterdam se caracterizaron por presentar concentraciones altas de magnesio (Mn) y vanadio (V) en la fracción gruesa. El plomo (Pb) y Zn fueron relativamente altos en la fracción PM2.5 de Lodz. El hierro (Fe), manganeso (Mg), aluminio (Al), cromo (Cr) y cobre (Cu), usualmente se encontraron en la fracción gruesa, mientras que el Zn, Pb, níquel (Ni), y V son constituyentes importantes de la fracción PM2.5 (Steerenberg et al., 2006).

En el caso de los constituyentes inorgánicos, los nitratos ( $\text{HNO}_3$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), amonio ( $\text{NH}_3$ ), cloro (Cl), potasio (K), y sodio (Na) fueron los mayores constituyentes de las muestras del PM. El Cl y Na fueron componentes sustanciales de las muestras de Ámsterdam y de Zilk. Los ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y  $\text{HNO}_3$  se encontraron principalmente en la fracción PM2.5. Los niveles altos de K se hallaron en las muestras de Roma (Steerenberg et al., 2006). Para los constituyentes orgánicos, los altos niveles de PAHs se hallaron en las muestras de Lodz, particularmente en el invierno. Además, otros patrones fueron hallados como biomarcadores del tráfico vehicular, tales como los hopanos y esteranos que se encontraron principalmente en las PM2.5 de invierno y de verano en las muestras de Oslo. Estos elementos están asociados en invierno a PM de Roma y en verano a muestras de Lodz. Sin embargo, este patrón no fue reflejo de los niveles de hopano, los cuales fueron predominantes tanto en primavera como en invierno en las PM de Lodz, Oslo y Roma (Steerenberg et al., 2006). Además, el análisis mostró un ranking de las ciudades de acuerdo al efecto adyuvante de la siguiente manera, Lodz > Roma ≥ Oslo > Ámsterdam. Las partículas de de Zilk mostraron ser menos potentes que las



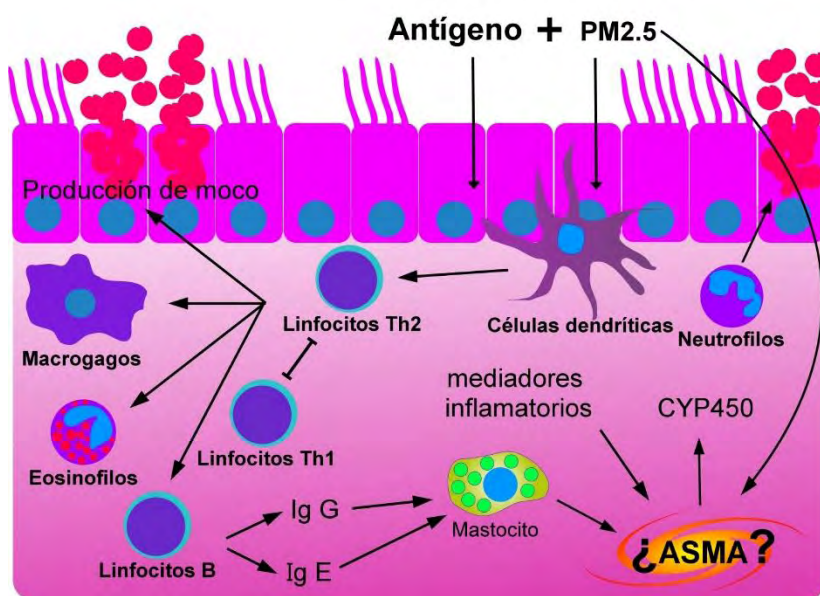
partículas de Lodz, pero son comparables con las PM de Roma y Oslo, y tienen mayor efecto adyuvante que las partículas de Ámsterdam. Ambas fracciones fueron activas. Sin embargo la fracción gruesa produjo mayor efecto adyuvante que la fracción fina (Steerenberg et al., 2005).

### **4.3 Asma y citocromo P450**

La relación asma, contaminación y citocromo P450 es escasa en la literatura científica, sin embargo, se conoce que los contaminantes, principalmente los PAHs son metabolizados y en algunos casos bioactivados por las isoformas CYP1B1, CYP1A1 y CYP1A2 (Ioannides, 2008), mientras que los metales pueden disminuir la actividad de estas isoformas aún con la administración conjunta de PAHs (Anwar-Mohamed et al., 2009). Además, se conoce que las infecciones o la inflamación de tipo crónico estimula la actividad de varias isoformas del CYP450 en hígado y tejidos extra hepáticos como cerebro. Los lipopolisacáridos (LPS) pueden suprimir la actividad del CYP1A1 cuando se administra una inyección intracerebroventricular (Morgan, 2001). A diferencia de CYP1A1 y CYP1A2 que pueden ser modulados por metales y PAHs, el CYP2E1 puede ser modulado por el proceso de inflamación, ya que IL-1 $\beta$  induce la transcripción de esta isoforma en conejo y algunos sitios del promotor que son responsables de la regulación del INF- $\gamma$  e IL-4. Es decir, el incremento en la respuesta inflamatoria puede modular el CYP2E1 a través de las interleucinas IL-4, IL-6, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , esta última modula al CYP1A1 (Ioannides, 2008). Sin embargo, el modelo de inflamación de anafilaxia inducida a través de ovoalbúmina (OVA) en ratones que recibieron esta proteína por medio de una inyección intraperitoneal no mostraron efecto sobre los CYP evaluados como CYP1A2, CYP 2B10 y CYP3A (Moriya et al., 2014). Hasta el momento, este tipo de estudios no se han realizado en nuestro país y es importante responder varias preguntas importantes sobre este tema.

## 5 JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de las enfermedades alérgicas se ha incrementado en los últimos años en todo el mundo y México no es la excepción. La tendencia probablemente está relacionada con la gran cantidad de fuentes de emisión de PM, ya que el número de vehículos automotores también se ha elevado notablemente. Por lo que resulta preponderante evaluar las alteraciones que provocan las partículas de la Ciudad de México en el modelo experimental de asma en cobayos sensibilizados a ovoalbúmina, el cual está perfectamente establecido en nuestro laboratorio, ya que produce cambios como la hiperreactividad pulmonar, bronco espasmo reversible e inflamación crónica similar a humanos. Por lo anterior, planteamos la siguiente pregunta ¿La exposición a PM<sub>2.5</sub> de la Ciudad de México es capaz de funcionar como adyuvante en el proceso de sensibilización y/o alterar el mecanismo de metabolismo de xenobioticos? (Figura 9)



**Figura 9.** ¿La exposición a PM<sub>2.5</sub> de la Ciudad de México será capaz de funcionar como adyuvante en el proceso de sensibilización y aumentar el daño pulmonar en el modelo de sensibilización alérgica en cobayos? Además, ¿producirá cambios en el mecanismo de metabolismo de xenobioticos, CYP450?

## 6 HIPÓTESIS

La inhalación de PM2.5 incrementará las crisis asmáticas en los animales sensibilizados con ovoalbúmina más Al(OH)<sub>3</sub>, e inducirá un efecto adyuvante en los animales sensibilizados solo con el antígeno (OVA).

## 7 OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Evaluar el daño morfo-fisiopatológico e inmunológico involucrado en la exposición a PM2.5 en el modelo de sensibilización de asma alérgico en cobayos (*Cavia porcellus*).

### 7.2 Objetivos particulares

1. Determinar la composición del PM2.5 de la Ciudad de México  
Evaluar el efecto de la exposición a PM2.5 en cobayos sensibilizados y no sensibilizados a ovoalbúmina con la finalidad de:
2. Identificar las alteraciones fisiológicas respiratorias, mediante el uso de la pletismografía barométrica.
3. Evidenciar la respuesta inflamatoria a través del conteo diferencial celular en el BAL
4. Identificar los efectos tóxicos histopatológicos mediante tinción de:
  - Masson (Fibrosis).
  - PAS (metaplasia mucoide).
5. Evaluar los biomarcadores de daño pulmonar y del proceso de sensibilización mediante ensayos de ELISA.
  - CC16
  - IgG inespecífica
  - IgG específica para ovoalbúmina
  - IgE específica para ovoalbúmina

6. Dilucidar el perfil inmunológico en lavados bronco-alveolares mediante ensayo Bio-plex pro para el perfil inmunológico Th1/Th2 (IL-2, 4, 5, 10, 12, GM-CSF, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ).
7. Evaluar el efecto que tiene dicha inhalación en el sistema metabólico del CYP450 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1) en microsomas de pulmón.

## 8 METODOLOGÍA

El protocolo para esta investigación fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, (INER), Ismael Cosío Villegas de la Secretaría de Salud con el número B21-13 (Anexo II).

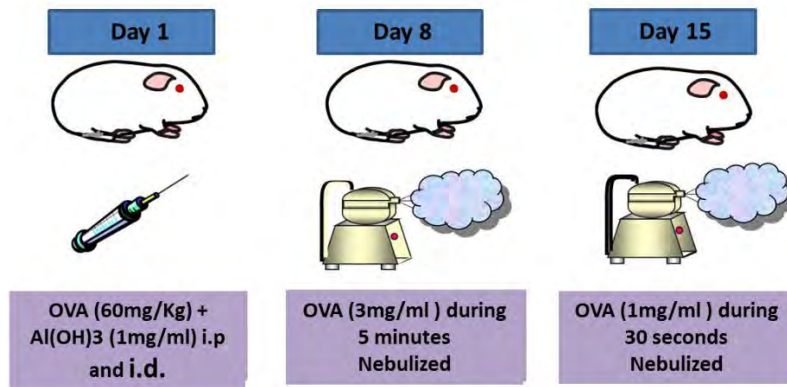
### 8.1 Los animales

Para este estudio, se utilizaron 30 cobayos machos de 450-500 gramos de peso (de dos a tres meses de edad). Los animales fueron alimentados (Tekland, dieta para cobayo 7006, Harlan, Madison, WI) y bebieron agua destilada *ad libitum*. Se dividieron en 5 grupos de 6 animales cada uno. Se sensibilizaron los animales el día 1 mediante una mezcla de 60  $\mu$ g Ovoalbúmina y 1mg de hidróxido de aluminio [Al(OH)<sub>3</sub>] como adyuvante (i.p. y s.c.) o solamente fueron sensibilizados con ovoalbúmina (sin adyuvante) disuelto en NaCl 0.9%. El día 8 y 15 inhalaron 3mg/ml y 1mg/ml de OVA en NaCl 0.9% a través de un nebulizador (Model WH-802, Yuehua medical instrument Factory, Co. Guangdong, China) (Figura 10).

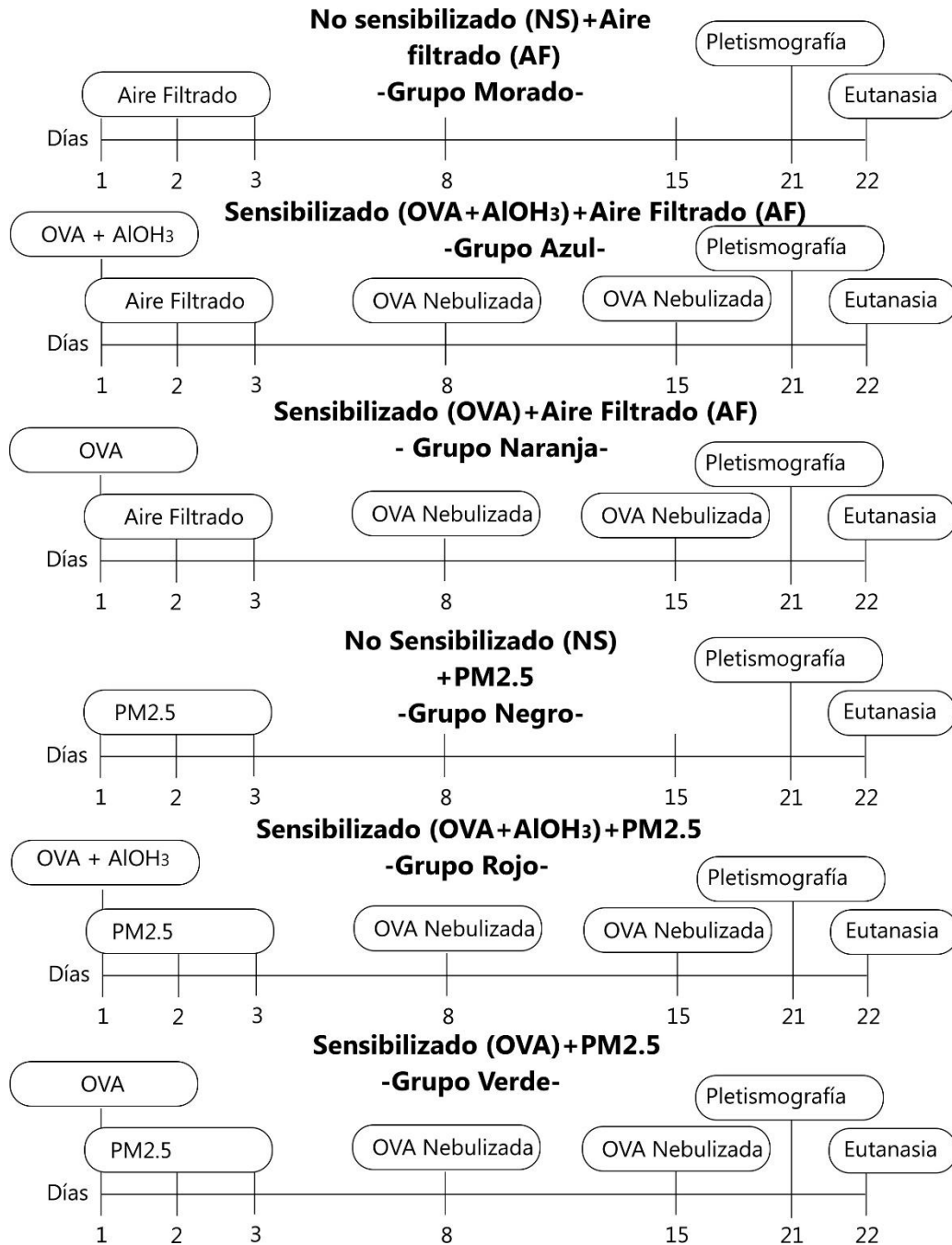
### 8.2 Diseño Experimental

Los animales inhalan aire filtrado (AF) o PM2.5 los días 1, 2 y 3 de octubre de 2013 (8AM-1PM) mediante un Sistema Concentrador de Partículas (SCP) ubicado en CINVESTAV-Zacatenco. El día 21-22, se realizó el análisis de la fisiología respiratoria en el pletismógrafo barométrico (DSI, Buxco). El día 22-23 se realizó el sacrificio de los animales mediante la administración de pentobarbital

sódico (35mg/Kg i.p), siguiendo el esquema siguiente para el realizar el estudio (Figura 11).



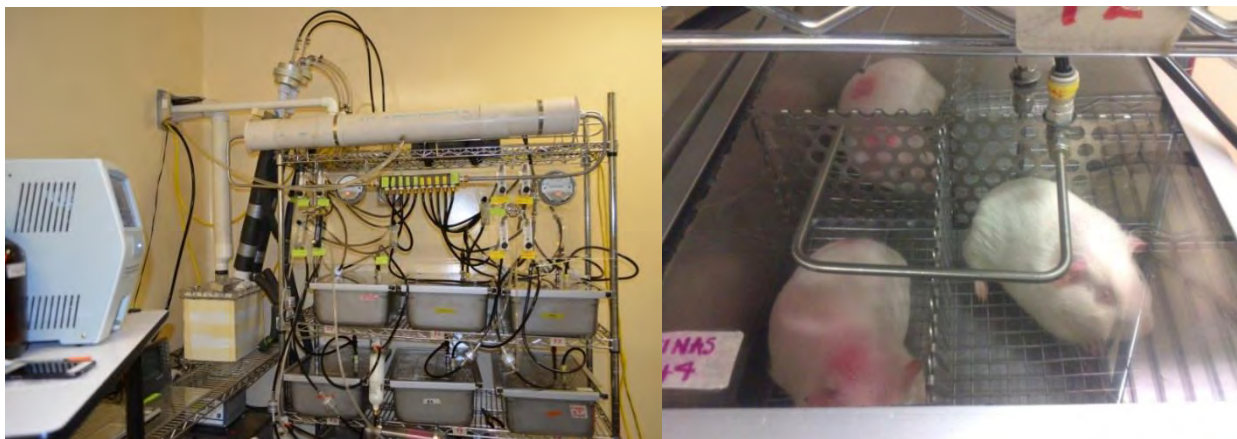
**Figura 10.** Proceso de sensibilización mediante la inyección de ovoalbúmina + hidroxilo de aluminio en el cobayo. (Esquema realizado por Vargas-Becerra M).



**Figura 11.** Grupos experimentales. Día 1, los animales se sensibilizaron con una inyección de OVA+AIOH<sub>3</sub> o solo OVA. El día 1, 2 y 3 Inhalaron aire filtrado (AF) O partículas finas (PM2.5). El día 8 y 15 inhalaron OVA nebulizada. El día 21 y 22, se realizó el registro en el Pletismógrafo barométrico el día 22-23 se llevó acabo el sacrificio de los animales. No sensibilizado + Aire filtrado: NS+AF, No sensibilizado + PM2.5: NA+PM2.5, Sensibilizado + adyuvante + Aire filtrado: S+Adj+AF, Sensibilizado + adyuvante + PM2.5: S+Adj+PM2.5, Sensibilizado + Aire filtrado: S+AF y Sensibilizado + PM2.5: S+PM2.5. Los animales inhalaron AF o PM2.5 5 horas por días durante 3 días, cumpliendo un total de 15h.

### 8.3 El sistema concentrador de partículas

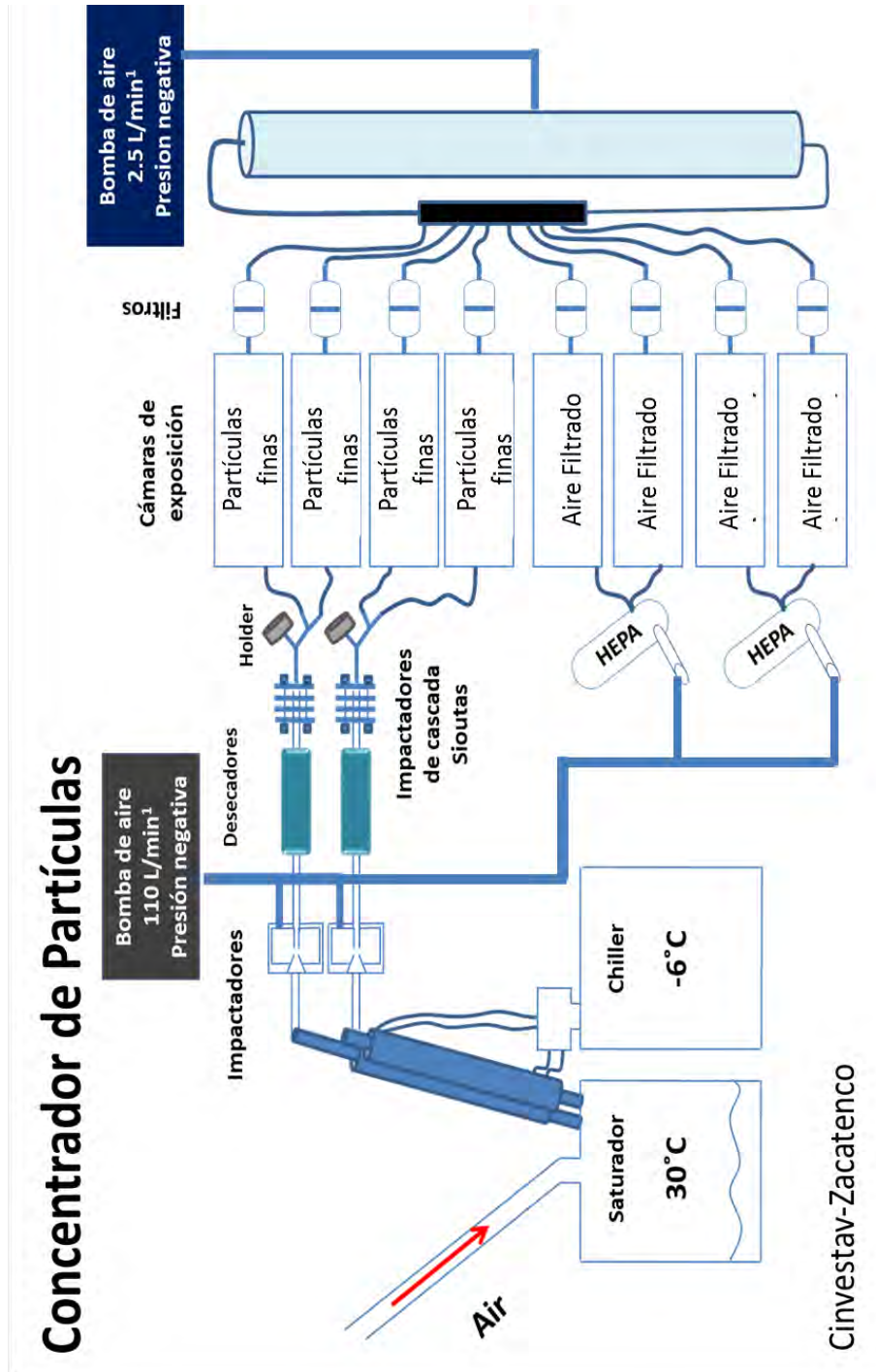
El SCP es un equipo que se encuentra ubicado al norte de la Ciudad de México, exactamente en CINVESTAV-Zacatenco. Es un sistema el cual permite la exposición de los animales a través de la vía inhalada en tiempo real a PM de la Ciudad de México (Figura 12).



**Figura 12.** Sistema Concentrador de Aerosoles. Este equipo permite la exposición por vía inhalada y en tiempo real a PM de la Ciudad de México.

Básicamente, el equipo funciona mediante dos bombas de vacío, una bomba mayor (115 L/min) y una bomba menor (2.5 L/min). El objetivo es coleccionar aire, el cual pasa por una serie de dispositivos que lo calientan a 30°C y enfrían a -6°C. Luego, el PM es separado por un filtro Venturi, el cual permitirá el paso del PM<sub>10</sub>. Enseguida las muestras ingresan por un desecador y luego por una serie de filtros en cascada, permitiendo el paso de las PM<sub>2.5</sub>. Después de la salida del filtro de cascada, la toma se divide en dos, una salida termina en las cajas de inhalación que están cerradas herméticamente y la otra tiene acoplado filtros de teflón, los cuales permiten realizar estudios de composición y gravimetría. Por otro lado, otras dos tomas están acopladas a filtros HEPA, filtros de óxidos de nitrógeno y carbón, de esta manera los animales expuestos a aire filtrado no inhalan partícula alguna. El proceso de calentamiento, enfriamiento y desecación del PM en el sistema

concentrador de partículas, simula la dinámica atmosférica, de esta manera las partículas son enriquecidas (Figura 13).



**Figura 13.** Sistema concentrador de partículas. Toma muestras de aire de la Ciudad de México.



## 8.4 Pletismografía barométrica

El día 21 se realizaron los ensayos de fisiología respiratoria después del reto de OVA (0.5mg/mL/60s). Cada animal estuvo en una cámara de libre movimiento y utilizando pletismografía barométrica (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) se obtuvo el índice PENH conocido como enhanced pause o pausa incrementada el cual es un reflejo de la resistencia de las vías aéreas (Vargas et al., 2010) causado por la obstrucción de éstas. Medimos el Penh antes y después del reto a OVA, después del reto se hizo un registro durante 15 min. Evaluamos la respuesta positiva si el índice de Penh incrementaba de 2 a 6 veces más que la línea basal antes del reto de OVA representando el grado de hiperreactividad. El PENH está determinado por (Figura 14):

$$\text{penH} = \text{Te}/\text{RT}-1*\text{PEF}/\text{PIF}$$

Te= Tiempo de espiración

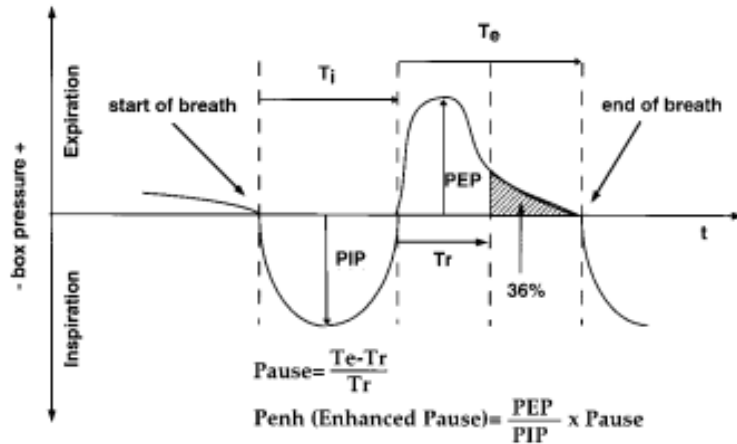
RT= Tiempo de relajación

PEP= Pico del flujo espiratorio

PIP= Pico del flujo inspiratorio

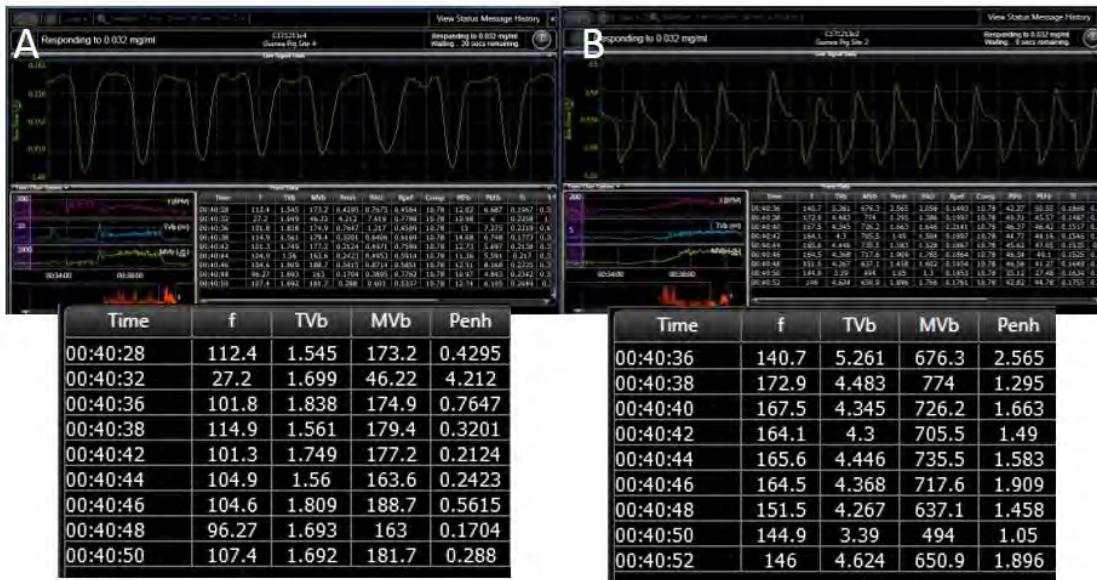
En donde  $\text{Te}/\text{RT}-1$  = pausa; por lo tanto, la ecuación queda de la siguiente manera:

$$\text{penH} = \text{Pausa}(\text{PEF}/\text{PIF})$$



**Figura 14.** Registro pleto-métrico. Obtención del PENH a través de la medición de flujos respiratorios de los animales. Tomado de (Hamelmann et al., 1997).

Cuando la resistencia u obstrucción de la vía aérea aumenta, el flujo del pico espiratorio (PEP) también aumenta. La fase de inclinación del flujo torácico en el flujo espiratorio incrementa mostrando una meseta (Figura 15).



**Figura 15.** Registro pleto-métrico. A) Curva y valores del PENH de un animal sano. B) Curva y valores del PENH de un animal asmático el cual presenta bronco-obstrucción. El PEP incrementa mostrando una meseta, además el pico espiratorio e inspiratorio están alterados en comparación con la figura A).

## **8.5 Lavado bronco-alveolar**

24h después del registro en el pletismógrafo, los animales fueron sacrificados con una inyección de pentobarbital (35 mg/Kg). El BAL se realizó mediante la instilación de 5 mL de solución salina (37°C) (duplicado) de una cánula en la tráquea. Cada instilación se mantuvo en los pulmones por 1 min, se recuperó y se almacenó a 4°C. El BAL fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C para realizar los ensayos de ELISA y Bio-plex. El botón obtenido fue resuspendido con 1 mL de solución salina. Se realizó la tinción vital con azul de tripano para el conteo total en una cámara de Neubauer (Hauser Scientific, Horsham PA, USA). Se hicieron las laminillas de la re-suspensión celular utilizando una cito-centrifuga (Cyto cent, Wescor Inc., Utah, USA). Las laminillas fueron teñidas con Giemsa para realizar el conteo diferencial. El conteo total fue expresado en células/mL y el conteo diferencial fue expresado como porcentaje celular.

Técnica Giemsa para frotis (células en medio líquido)

Las laminillas fueron fijadas con metanol durante 5 a 7min, se secaron al aire. El colorante Giemsa fue diluido 1:20 con agua desionizada (el color puede variar de acuerdo a la dilución en el buffer). Se tiñeron las laminillas durante 15 a 60min. Estas se lavaron con agua desionizada, se secaron al aire y se montaron con resina sintética para su evaluación al microscopio.

## **8.6 Histología y análisis morfométrico**

Después de obtener el BAL, el bronquio extra-pulmonar derecho se pinzó y se fijó el pulmón izquierdo mediante la instilación intra-traqueal de formol amortiguado al 10%. El pulmón derecho fue congelado y almacenado a -80°C. En los pulmones fijados se realizó la técnica histológica convencional para ser cortado en secciones de 3-5  $\mu\text{m}$  de espesor. Después fueron teñidos con H-E, Masson y ácido peryódico de Schiff (PAS).

## Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E)

La tinción de H-E es una tinción de rutina para evidenciar núcleos y citoplasma y sirvió para localizar y analizar infiltrado en el pulmón. Las laminillas se desparafinaron en xilol (30 lavados), se rehidrataron en alcoholes graduales (96°, 80°, 70°, 60° y 50°, 30 lavados en cada uno) y al finalizar se lavaron en agua destilada (30 lavados). Posteriormente fueron teñidas con hematoxilina durante 2-5 min y después se lavaron con agua corriente hasta quitar el exceso de color. Nuevamente se lavaron con agua destilada (30 lavados) y después se tiñeron con eosina al 0.2% durante 30 a 60s. Las laminillas se introdujeron en alcohol ácido para virar el color. Después de este procedimiento, las laminillas se deshidrataron en alcoholes graduales (70°, 80°, 96°, 30 lavados), se lavaron nuevamente en xilol (30 lavados) y se montaron con resina sintética para su posterior evaluación al microscopio. El resultado de la tinción es núcleos: morado-azul y citoplasma: rosa.

## Tinción Tricrómico de Masson

La tinción de Masson evidencia las fibras de colágena y sirve para evaluar la presencia de fibrosis en los tejidos en este caso de pulmón. Para esto, las laminillas se desparafinaron en xilol (30 lavados), se rehidrataron en alcoholes graduales (96°, 80°, 70°, 60° y 50°, 30 lavados en cada uno), se fijaron en la solución de Bouin durante 1 h a 56-60°C. Después de este paso, se lavaron nuevamente y se tiñeron con la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min. Nuevamente se lavaron con agua corriente por 10 min para su diferenciación para su posterior tinción con fucsina-escarlata (90mL de Escarlata de Biebrich 1% de agua destilada, 9mL de fucsina ácida en solución acuosa al 1% en agua destilada y 1mL de ácido acético). Después se lavaron en agua destilada (30 lavados), posteriormente se colocaron en ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada durante 15 min. En seguida se colocaron en el colorante azul de anilina durante 5 min, se lavaron nuevamente con agua destilada (2-4 lavados) y se diferenció el color en ácido acético al 1% en agua destilada (3-5 min). Las laminillas se deshidrataron en alcoholes del 90° y 96°

rápidamente, se lavaron en xilol (15 lavados) y se montaron con resina sintética. El resultado fue núcleos: negros, citoplasma, queratina, fibras musculares y fibras intercelulares: rojo y colágena: azul.

#### Tinción Ácido Peryódico de Schiff

La tinción de PAS oxida grupos glicoles a aldehídos. El reactivo de Schiff se une a estos y al final evidencia a las mucoproteínas de color fucsia. Las laminillas fueron desparafinadas en xilol (30 lavados), se rehidrataron en alcoholes graduales (96°, 80°, 70°, 60° y 50°, 30 lavados en cada uno) y se tiñeron con ácido peryódico al 0.5% en solución acuosa durante 5 min. Después se lavaron con agua destilada y nuevamente fueron teñidas pero ahora con el reactivo de Schiff en un microondas durante 20 s, se removieron y nuevamente se introdujeron al microondas 15-20 s al finalizar este paso las muestras se quedaron durante 90min en la solución caliente. Se lavaron con agua por 10 min y se contra tiñeron con hematoxilina de Harris en el microondas durante 20-30 s. Se lavaron con agua destilada, se deshidrataron, limpiaron y montaron con resina sintética. Los resultados de la técnica muestran el glicógeno, mucinas, membranas basales y retículo de rojo-rosa y los núcleos de color azul.

Los resultados fueron presentados como porcentaje de células PAS+ en relación a aquellas PAS-. Para ello se contaron el número de células PAS+ presentes en 20 bronquiolos.

## 8.7 Ensayos de ELISA

El sobrenadante del BAL sirvió para realizar los ensayos de ELISA para evaluar biomarcadores del proceso de sensibilización como: IgG inespecífica (564155), IgG1 OVA específica (746691), IgE OVA específica (701476), y la proteína CC16 (724602) como biomarcador de daño y exposición a PM2.5 (MyBioSource, San Diego, CA, USA). Se realizaron duplicados y se siguieron las

instrucciones de manufactura. Para determinar la densidad óptica, se utilizó un lector de placas (Synergy HTX, Multimode Reader, Bio Tek, Vermont, USA) y se leyeron a 450 nm. Las muestras se analizaron utilizando (Gen5™ Microplate Reader and Imager Software).

## **8.8 Ensayo Quimiluminisencia bio-plex Pro**

Asimismo, con el sobrenadante del BAL se realizó el ensayo Bio-plex pro para el panel de 8 citocinas, perfil inmunológico Th1/Th2, el cual incluye IL-2, 4, 5, 10, 12, GM-CSF, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Th1/Th2 panel M60-00003J7, Bio-Rad, Hercules, CA). La ventaja de este ensayo es el uso de pequeñas cantidades de muestra (50 $\mu$ L) y el gran número de proteínas analizadas. Las muestras se trabajaron por duplicado y se siguieron las instrucciones de manufactura (Anexo 1). La placa se leyó en un Bio-plex multiplex System 200 a 523 y 625nm. Los resultados se analizaron en el software Bio-plex 6.0. (Hercules, CA. Bio-Rad)

## **8.9 Ensayo de Actividad CYP450**

Los pulmones almacenados a -80°C fueron descongelados y cortados. Se añadió tres veces el volumen de solución de KCL 0.15M con respecto al peso de cada muestra. (3mL/g de peso de pulmón). Se homogenizaron en un homogenizador Potter-Elvehjem a 4°C y se centrifugaron a la misma temperatura a 9000 g durante 9 min. Se recuperó el sobrenadante (la fracción S-9) y se almacenaron a -80°C. La fracción S-9 se descongeló y se centrifugó a 100 000 g durante 1 h. Después se resuspendió con el homogenizador manual de cristal esmerilado. Se centrifugó nuevamente a 100 000 g durante 1 h a 4°C. Se recuperó el botón, y se agregó amortiguador de fosfato de potasio 0.1M (pH 7.4), se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C. La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad enzimática se cuantificó en una placa de 96 pozos. Para ello se utilizó buffer de actividad (1.515 g de tris base y 1.27g de  $MgCl_2$ ) disuelto en agua destilada (pH7.6). Se aforó a 250 mL y filtró ( $0.45\mu m$ ). Se preparó el sustrato EROD para actividad CYP1A1, MROD para actividad CYP1A2. 2.5 mM de NADPH se agregó a cada pozo para detonar la reacción. Las curvas patrón se realizaron con diferentes concentraciones de resorufina (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol)

En cada pozo de las muestras y los blancos se colocaron  $5\mu L$  de sustrato (EROD o MROD según sea el caso) y  $80\mu g$  de proteína; excepto para CYP1A2 que requirió  $150\mu g$ . Se ajustó el volumen final con  $155\mu L$ . La placa se incubó durante 3 min a  $37^\circ C$  en el equipo lector de placas (Synergy HTX, multimode Reader, Bio Tek, Vermont, USA). Después de este tiempo se agregó  $40\mu L$  de NADPH a todos los pozos que contenían las muestras de microsomas. La placa se leyó en intervalos de 20s, durante 15min. Se midió la fluorescencia a una longitud de excitación de 530nm y una longitud de onda de emisión de 590nm.

Para la actividad de la isoforma CYP2E1 se utilizó como sustrato 7-metoxi-4-trifluorocumarina (MFC) para formar el metabolito 2-hidroxi-4-trifluorocumarina (fluorescente). Las muestras al igual que las isoformas anteriores también fueron leídas en una placa de 96 pozos. La curva patrón se realizó con 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nmol de HFC. En cada pozo se agregó  $6\mu L$  de MFC mM y  $120\mu L$  de amortiguador y  $40\mu L$  de NADPH y la cantidad necesaria de proteína ( $20\mu g$ ) por pozo. EL volumen final fue ajustado en  $100\mu L$  en cada pozo. Se incubó a  $37^\circ C$  por 10 min en el equipo lector de placas (Synergy HTX, Multimode Reader, Bio Tek, Vermont, USA). Pasando este tiempo se agregó  $100\mu L$  del sustrato pre incubado a todos los pozos que contenían las muestras. La placa se leyó en intervalos de 20s durante 120 min. Se midió la fluoresceína a una longitud de onda de excitación de 409nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

## 8.10 Análisis del PM2.5

En el SCP la temperatura y el flujo fueron controlados durante la exposición, se controló la ventilación y la transpiración. Se utilizaron filtros de teflón de 37mm (PTFE 2 mm pore, Gelman Science, Ann Arbor, MI), los cuales fueron pesados y equilibrados. Durante los tres días de exposición, los filtros fueron almacenados a 4°C. Al final de la exposición los filtros se removieron de sus casetes y nuevamente se pesaron para determinar la concentración de masa. El análisis elemental se realizó mediante la técnica de Fluorescencia de Rayos X (XRF). Se utilizó un espectrómetro de rayos X desarrollado en el Instituto de Física de la UNAM (IF-UNAM), para aplicaciones ambientales, el cual consiste en un tubo de rayos X (Oxford Instruments) con un ánodo de Rh, así como un detector de rayos X Amptek Si-PIN (resolución 160 eV a 5.9 keV). El tubo de rayos X fue operado a 50 kV y con una corriente de 250  $\mu$ A, la irradiación de las muestras fue durante 1200 s por cada espectro. Las eficiencias de los sistemas de detección se midieron utilizando estándares de película delgada de elementos patrón o compuestos puros (MicroMatter Co., Vancouver, Canadá) en todos los casos. Los espectros resultantes se integran con el programa Win-QXAS para XRF, para obtener las concentraciones elementales (Manual for QXAS, 2005) (Espinosa et al., 2012).

## 8.11 Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PHAs)

El contenido de PAHs fue analizado en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), modelo 6890 plus/5973N Agilent Technologies, CA, USA. Para la identificación de cada PAHs se utilizaron el tiempo de retención relativo y sus iones secundarios. Se utilizó un inyector de temperatura programable, inyectando 1  $\mu$ L del analito en modo sin divisiones a 300 °C en una columna capilar DB35-MS (J&W Scientific, USA) de 30 metros de largo x 0.25 mm ID x 0.25  $\mu$ m de ancho. Se utilizó helio de alta pureza (99.999 % Infra) como gas transportador a un flujo de 1.2 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del horno fue programada de esta forma: 40°C 1 min, primer incremento 50 °C min<sup>-1</sup> hasta 110 °C, segundo



incremento 5°C min<sup>-1</sup> hasta 303 °C, tercer incremento 20°C min<sup>-1</sup> hasta 335 °C, durante 13 min. El tiempo total de corrida fue de 55.6 minutos. En la línea transferencia, la fuente de iones y las temperaturas fueron 300, 230 y 150°C, respectivamente. El espectrómetro de masas fue operado en el modo de ionización de electrones a 70 mV con un monitoreo selectivo para algunos iones (Villalobos-Pietrini et al., 2006; Amador-Muñoz O. et al., 2014).

## 8.12 Análisis de endotoxinas y glucano

Las endotoxinas y el (1-3)-β-D-Glucano fue evaluado por la técnica de pirocromo, método cromogénico cinético (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA). Las muestras de PM fueron resuspendidos en 50 mM Tris-buffer. Después, se sónico en baño maría durante 1 h a 22°C, con intervalos de agitación en un vortex de 1 min durante 15 min. Se realizaron diluciones 1:10 de cada suspensión preparada. El control de endotoxina fue derivado de *Escherichia coli* 0113:H10 (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA, Lot. 139) con el potencial de 18 UE/ng y (1-3)-β-D-Glucan standard 200 pg/mL (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA, Lot. 1189027), fueron usados como referencia. Las muestras fueron analizadas por duplicado usando un tubo lector, incubadas a 37°C en un Pyros Kinetix Flex Instrument (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA). La densidad óptica fue registrada mediante 405nm de longitud de onda. Los datos se analizaron en el programa Pyros EQS v 1.2.

## 8.13 Análisis estadístico

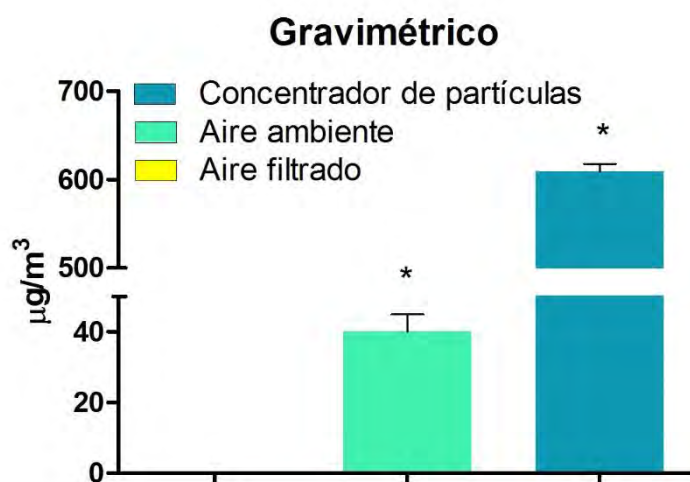
Todos los ensayos fueron realizados mediante ANOVA (Tukey) y *t-student* para distinguir las diferencias entre pares de grupos en el programa Prisma 5 (software, GraphPad, USA). Consideramos  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. Además, en las muestras para las citocinas realizamos un análisis multivariado utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para asociar dos o

más variables. Este análisis se realizó con el programa StatGraphics Centurion XVII (v17.1.12).

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Gravimetría

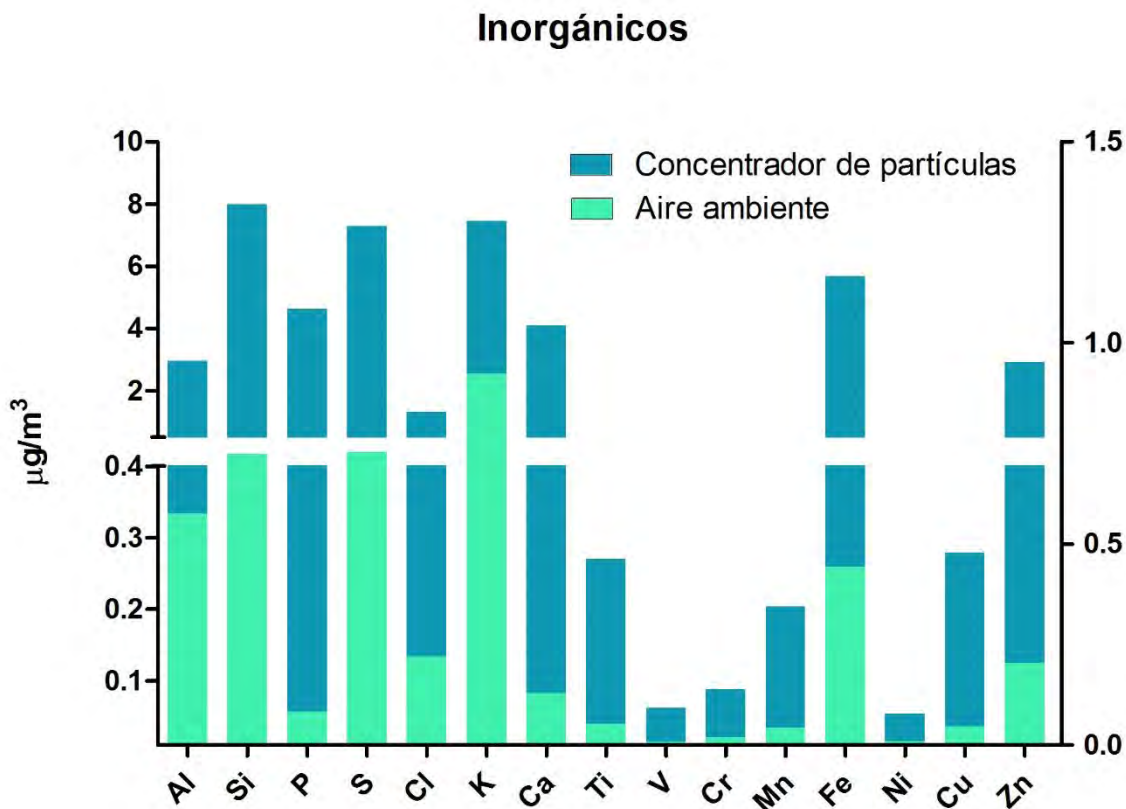
Los animales que inhalaban PM<sub>2.5</sub> concentradas durante las 15 h (5h/día/3 días) fueron expuestos a  $609 \pm 12.73 \mu\text{g}/\text{m}^3$  acumulado. Los muestreadores mini vol colectaron  $40 \pm 7.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente. Es decir, que el concentrador de partículas incrementó 15 veces más la concentración de PM<sub>2.5</sub> (Figura 16).



**Figura 16.** Gravimetría. Los animales inhalaban  $609 \pm 12.73 \mu\text{g}/\text{m}^3$  durante las 15 h (\* $p < 0.05$  Vs aire filtrado). Los muestreadores colectaron  $40 \pm 7.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$  y fueron significativamente diferentes (\* $p < 0.5$  Vs Aire filtrado).

## 9.2 Composición inorgánica del PM2.5

El análisis de inorgánicos evidenció que no todos los elementos se concentran proporcionalmente. Sin embargo, algunos elementos se concentraron por encima de  $2\mu\text{g}/\text{m}^3$  como el Al, Si, P, S, K, Ca, Fe y Zn. Por otro lado, otros elementos fueron pobremente concentrados como Ti, V, Cr, Ni y Cu (Figura 17).

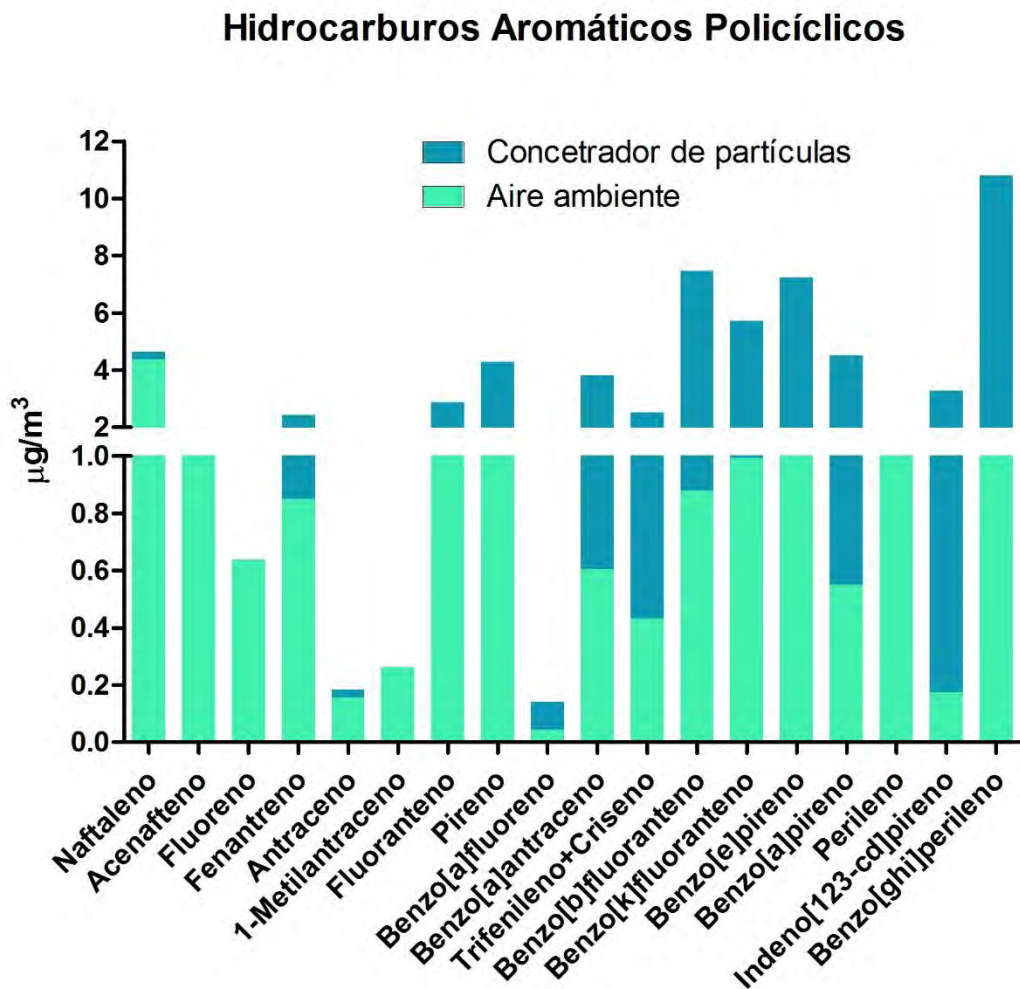


**Figura 17.** Análisis de elementos inorgánicos. Este análisis evidenció que los animales inhalaban ciertos elementos que se concentraron más como Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe y Zn. Por otro lado, otros elementos no fueron altamente concentrados como el V, Cr, Mn y Cu.

## 9.3 Composición orgánica del PM2.5

Tal como ocurrió en el análisis elemental, algunos PAHs también se concentraron no proporcionalmente. Los elementos más concentrados por encima de  $2\mu\text{g}/\text{m}^3$  fueron: fenantreno, pireno, benzo (a) antraceno, trifenileno+cristeno,

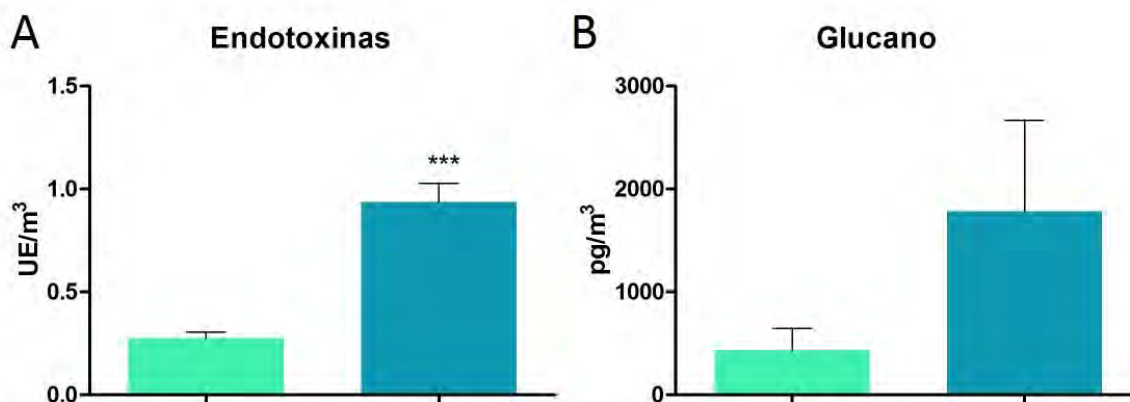
benzo (k) fluoreno, benzo (e) pireno, benzo (a) pireno, indeno (1,2,3-cd) pireno y benzo (ghi) perileno. Otros elementos a pesar de presentarse en el aire ambiente, no se concentraron más, como acenaptileno, fluoreno, antraceno y 1-metilantraceno (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Al igual que el análisis anterior, no todos los elementos son concentrados. Los animales estuvieron expuestos a 11 hidrocarburos de los 18 evaluados.

## 9.4 Composición de los elementos biogénicos del PM2.5

En los filtros se colectaron endotoxinas (Figura 19 A) y glucano (Figura 19 B). Sin embargo, solo los niveles de endotoxinas aumentaron significativamente con respecto al aire ambiente. Es decir, los animales fueron expuestos a compuestos biogénicos.

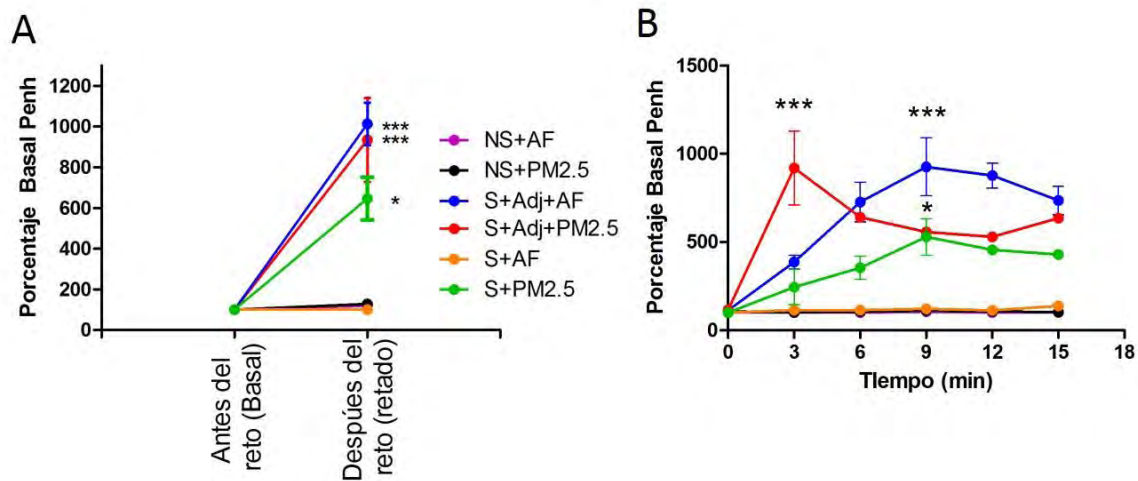


**Figura 19.** Análisis de compuestos biogénicos. El sistema concentrador de partículas concentró más las endotoxinas que el glucano. La concentración de endotoxinas fue significativamente más alta y a la cual estuvieron expuestos los animales durante las 15h (\*\*\*)  $p < 0.001$  Vs aire ambiente) *t de student*.

## 9.5 Fisiología Respiratoria

El análisis de fisiología respiratoria en el pletismógrafo mostró el valor basal de PENH en todos los grupos y cuya media fue de  $0.3367 \pm 0.07182$ , la cual fue tomada como 100% de la respuesta y a partir de allí se calcularon los cambios. Después del reto de OVA, los valores de PENH incrementaron de manera típica en el grupo S+Adj+AF, pero la inhalación de PM2.5 en el grupo S+Adj no incrementó más el PENH con respecto del grupo anterior, ambos mostraron un incremento de 10 veces sobre la línea basal del Penh. Además, las PM2.5 en el grupo solo sensibilizado (S+PM2.5) incrementó el Penh alrededor de 6 veces más (Figura 20 A). Por otro lado, el análisis a través del tiempo evidenció que las PM2.5 producen

una respuesta de hiperreactividad, justamente a los 3 min después del reto de OVA en el grupo S+Adj más que en el grupo S+Adj+AF, que muestra una respuesta típica a los 9 min después del reto de OVA. El grupo S+PM2.5 también incrementó el Penh después de 6min del reto de OVA, mostrando una respuesta lenta, pero al final los animales respondieron al antígeno. Esto muestra el efecto adyuvante que presenta del PM2.5 en presencia del antígeno en este modelo (Figura 20 B).

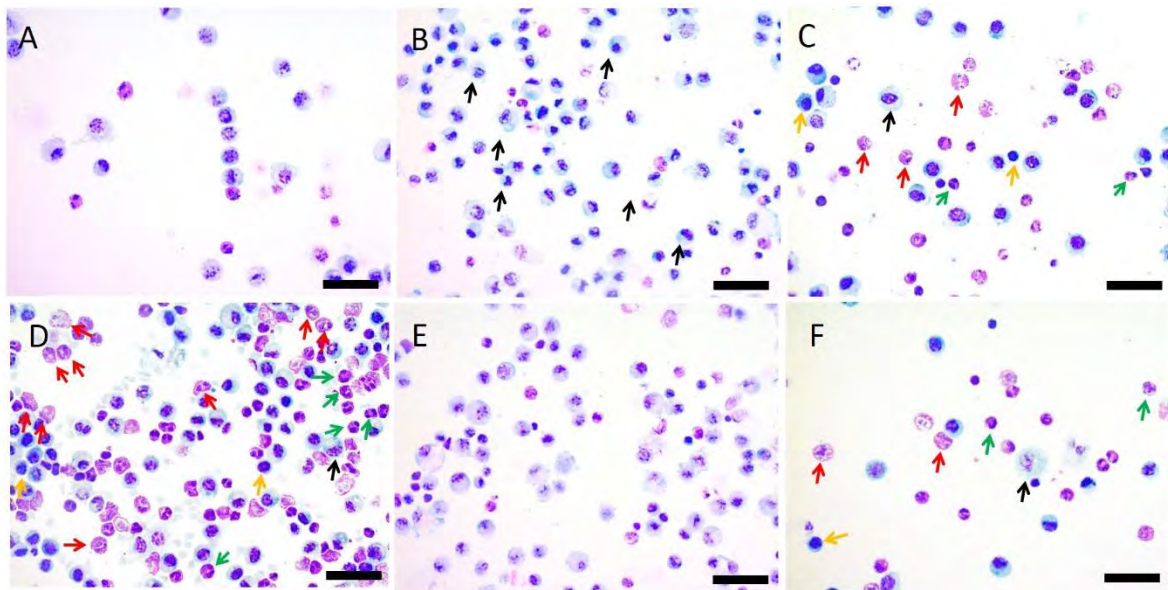


**Figura 20.** Pletismografía barométrica. A) Registro pletismográfico antes y después del reto a OVA. Los animales NS+AF; No sensibilizados + aire filtrado, NS+PM2.5; No sensibilizados + PM2.5 y S+AF; Sensibilizados + aire filtrado no incrementaron su Penh basal después del reto a OVA. Por otro lado, el grupo S+Adj+AF; sensibilizado + adyuvante + aire filtrado, mostró una respuesta típica de un grupo asmático, el índice de Penh se elevó 10 veces desde la línea basal (100%) (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). El grupo S+Adj+PM2.5; Sensibilizado + adyuvante + PM2.5 no mostró diferencias después del reto a OVA comparado con su grupo control S+Adj+AF, ya que también su Penh se elevó alrededor de 1000% (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). Interesantemente, el grupo S+PM2.5; Sensibilizado + PM2.5 después del reto a OVA incremento el índice de Penh aproximadamente 6 veces desde la línea basal (\* $p < 0.5$  Vs NS+AF). B) Registro durante 15 min después del reto a OVA. El grupo S+Adj+AF mostró una curva típica cuando es retado al antígeno (OVA). Tardó aproximadamente 9 min en presentar el pico más alto de Penh. Su contra parte S+Adj+PM2.5, mostró el pico más alto a los 3 min después del reto de OVA, mostrando un incremento en la hiperreactividad bronquial. El grupo S+PM2.5 mostró un incremento lento, el pico más alto fue a los 9 min después del reto a la OVA y los 9 min al igual que el grupo S+Adj+AF. Todos los análisis fueron realizados utilizando ANOV (tukey).

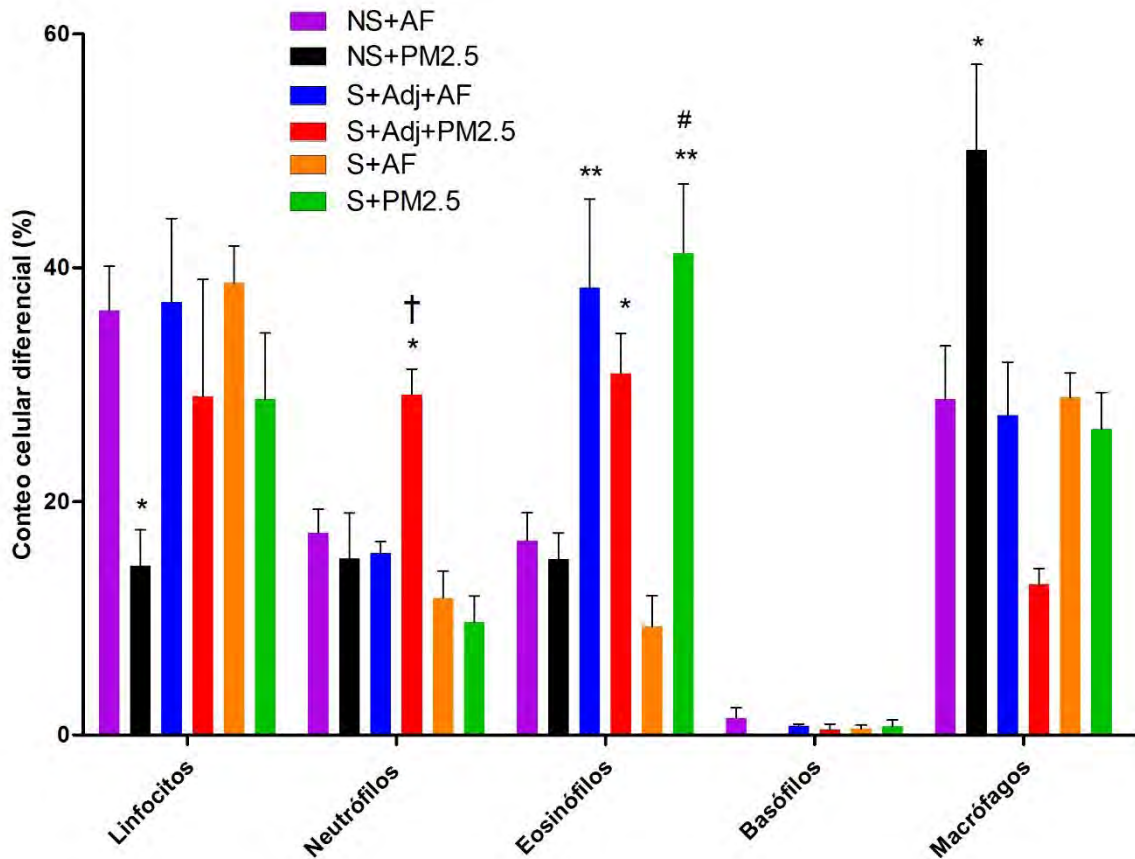


## 9.6 Inflamación pulmonar

El conteo celular por tinción de Giemsa (Figura 21 A-F) mostró en los grupos NS+AF y S+AF niveles basales de los diferentes tipos celulares evaluados. El grupo NS+PM2.5 solo incrementó el número de macrófagos con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo S+Adj+AF incrementó solo los eosinófilos como biomarcador de asma. En contraste, el PM2.5 en el grupo S+Adj no solo aumentaron los eosinófilos sino también los neutrófilos, evidenciando diferencias significativas comparando con el grupo S+Adj+AF. En el grupo S, el PM2.5 aumentó solo los eosinófilos. El incremento en porcentaje de eosinófilos solo fue significativamente diferente comparado contra el grupo NS+AF (Figura 22). El conteo total no mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados.



**Figura 21.** Micrografías de los lavados bronquioalveolares A) NS+AF, B) NS+PM2.5, C) S+Adj+AF, D) S+Adj+PM2.5, E) S+AF, F) S+PM2.5. Las flechas señalan: Negras; macrófagos, amarillas; linfocitos, rojas; eosinófilos y verdes; neutrófilos.



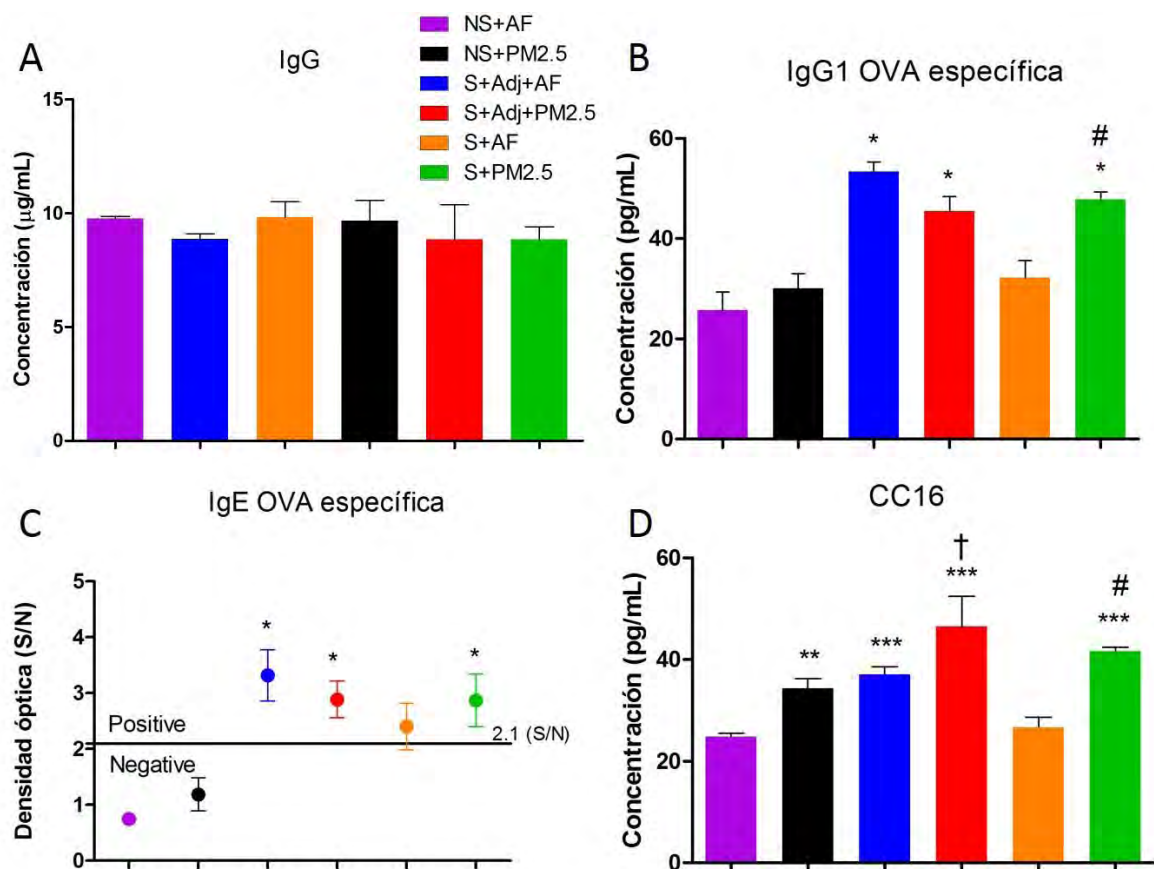
**Figura 22.** Conteo celular diferencial y total. Los grupos NS+AF y S+AF, mostraron niveles basales de los diferentes tipos celulares. El grupo NS+PM2.5 incrementó en número de macrófagos (\* $p < 0.05$  Vs NS+AF). El grupo S+Adj+AF, mostró un incremento en el porcentaje de eosinófilos solamente (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). El grupo S+Adj+PM2.5 también incrementó el porcentaje de eosinófilos (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). Asimismo, el porcentaje de neutrófilos también incrementó significativamente comparado contra el grupo no sensibilizado y su grupo control, ambos expuestos a aire filtrado (\* $p < 0.05$  Vs NS+AF; † $p < 0.05$  Vs S+Adj+AF). El porcentaje de eosinófilos también se incrementó en el grupo S+PM2.5 (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF; # $p > 0.05$  Vs S+AF). Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t* de Student.

## 9.7 Biomarcadores de asma y daño pulmonar

Los niveles del anticuerpo IgG inespecífica no mostraron cambios en todos los grupos comparados contra sus grupos controles (Figura 23 A). Los niveles de



IgG1 e IgE específicos para OVA mostraron diferencias significativas en los grupos: S+Adj+AF, S+Adj+PM2.5 y S+PM2.5 con respecto del grupo NS+AF (Figura 23 B y C). La cantidad de la proteína CC16 en el BAL incrementó en los mismos grupos que mencionamos anteriormente comparados contra sus grupos control. Sin embargo, incrementó significativamente aún más que el grupo S+Adj+PM2.5 respecto a su contraparte que inhaló AF (Figura 23 D).

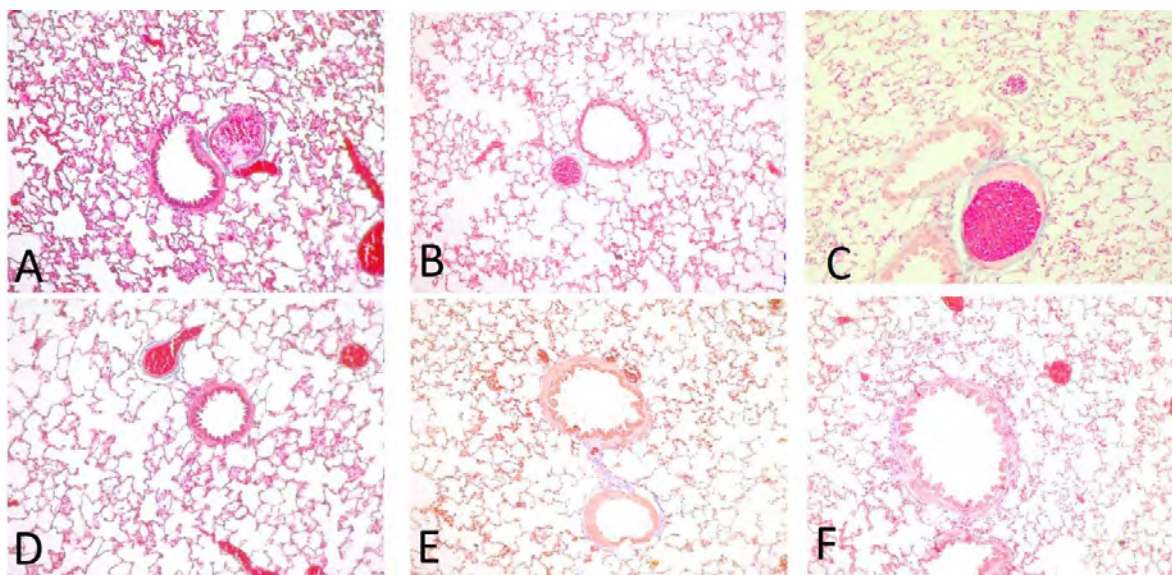


**Figura 23.** Ensayo de ELISA en lavados bronco-alveolares. A) Los niveles de IgG inespecífica no evidenciaron diferencias entre los grupos. B) Los grupos NS+AF, NS+PM2.5 y S+AF presentaron niveles basales, sin embargo, los grupos S+Adj+AF, S+Adj+PM2.5 y S+PM2.5 incrementaron significativamente (\* $p < 0.05$  Vs NS+AF). Además, el grupo S+PM2.5 también mostró diferencias contra su grupo control (# $p < 0.05$  Vs S+AF). C) Para el caso de la IgE específica para OVA, mostraron los mismos resultados significativamente

que la IgG1 (\* $p < 0.05$  Vs NS+AF). D) El proceso de sensibilización (S+Adj+AF) y la inhalación de PM2.5 (NS+PM2.5) incrementaron la proteína CC16 en los lavados broncoalveolares (\*\* $p < 0.01$  Vs NS+AF; \*\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). Además, este biomarcador incrementa aún más cuando los animales inhalan PM2.5 (S+Adj+PM2.5) mostrando diferencias significativas (\*\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF; † $p < 0.05$  Vs S+Adj+AF). El grupo S+PM2.5 también incrementó el daño por aumento de la proteína CC16 comparando contra su grupo control (\*\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF; # $p < 0.05$  Vs S+AF). Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t de Student* y ANOVA (tukey).

## 9.8 Morfología pulmonar

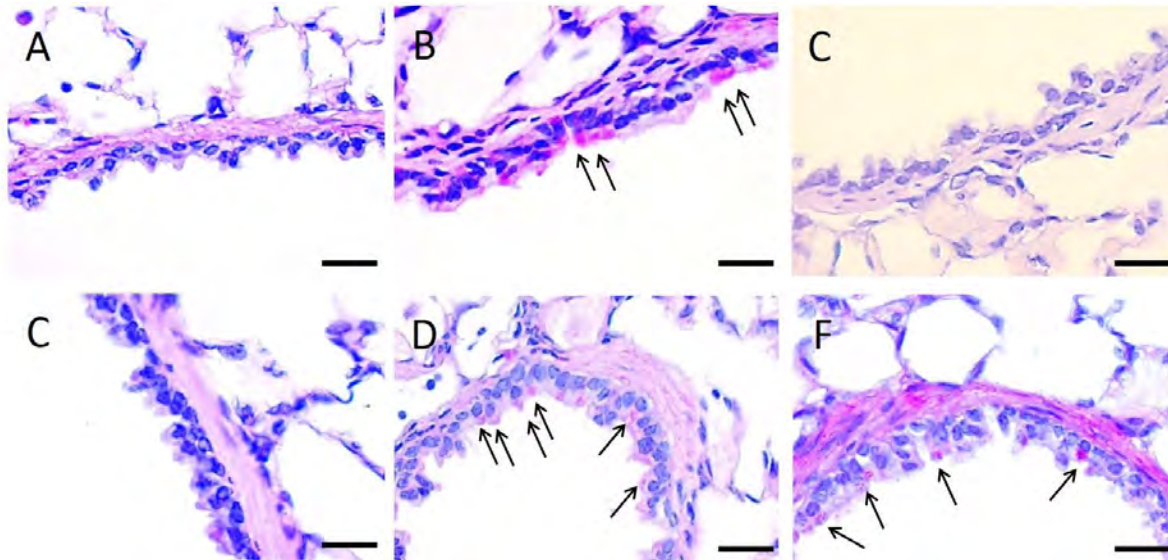
El análisis sobre fibrosis pulmonar realizado en los cortes histológicos de Masson no evidenció que la exposición a PM2.5 produjeran focos de tejido colágeno de color azul (Figura 24 A-F)



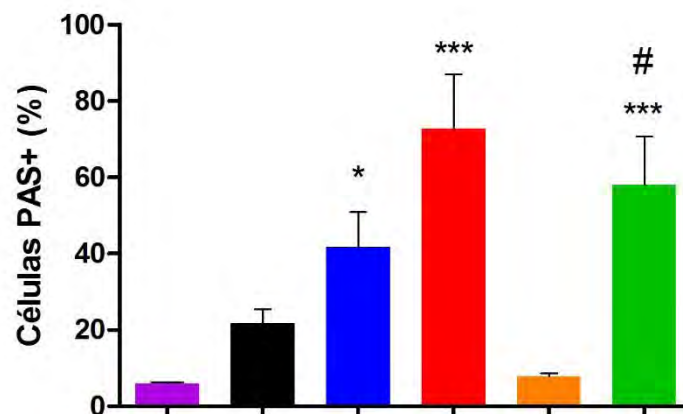
**Figura 24.** Micrográficas de los bronquiolos pulmonares teñidos con Masson. A) NS+AF, B) NS+PM2.5, C) S+Adj+AF, D) S+Adj+PM2.5, E) S+AF, F) S+PM2.5.

El análisis de las muestras teñidas con PAS (Figura 25 A-F) mostró que el modelo de sensibilización por sí solo produce metaplasia mucóide en los bronquiolos pulmonares, es decir, el número de células mucóides aumentó

aproximadamente un 40% con respecto del NS+AF (Figura 26). Este último evidenció un aumento mínimo del 3-5%. Sin embargo, la inhalación de PM2.5 incrementó el número de células más que el 70% y 60% en los grupos S+Adj y S, respectivamente (Figura 26).



**Figura 25.** Micrografías de los bronquiolos pulmonares teñidos con PAS. A) NS+AF, B) NS+PM2.5, C) S+Adj+AF, D) S+Adj+PM2.5, E) S+AF, F) S+PM2.5. Las flechas señalan las células productoras de moco, cuya zona apical se tiñe de color magenta y las cuales no son comunes en el epitelio bronquiolar.

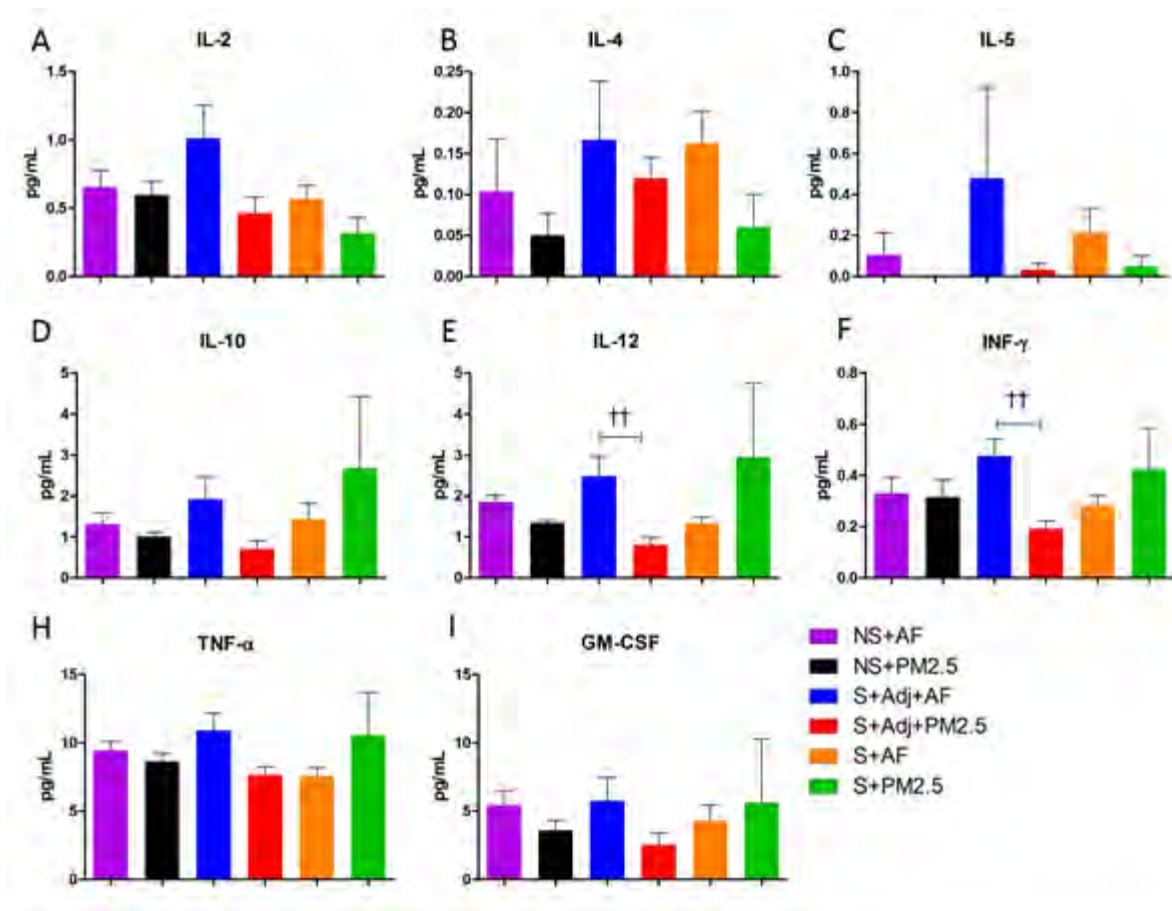


**Figura 26.** Conteo de células PAS+ en bronquiolos pulmonares teñidos con ácido Peryódico de Schiff. El grupo S+Adj+AF mostró diferencias significativas en el incremento en el

porcentaje de células PAS+ (\* $p < 0.05$  Vs NS+AF). Además, los grupos, S+Adj+PM2.5 y S+PM2.5 incrementaron el porcentaje de células productoras de moco (\*\* $p < 0.001$  Vs NS+AF). S+PM2.5 mostró diferencia significativa contra su grupo control (# $p < 0.05$  Vs S+AF). Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t de Student* y ANOVA (tukey).

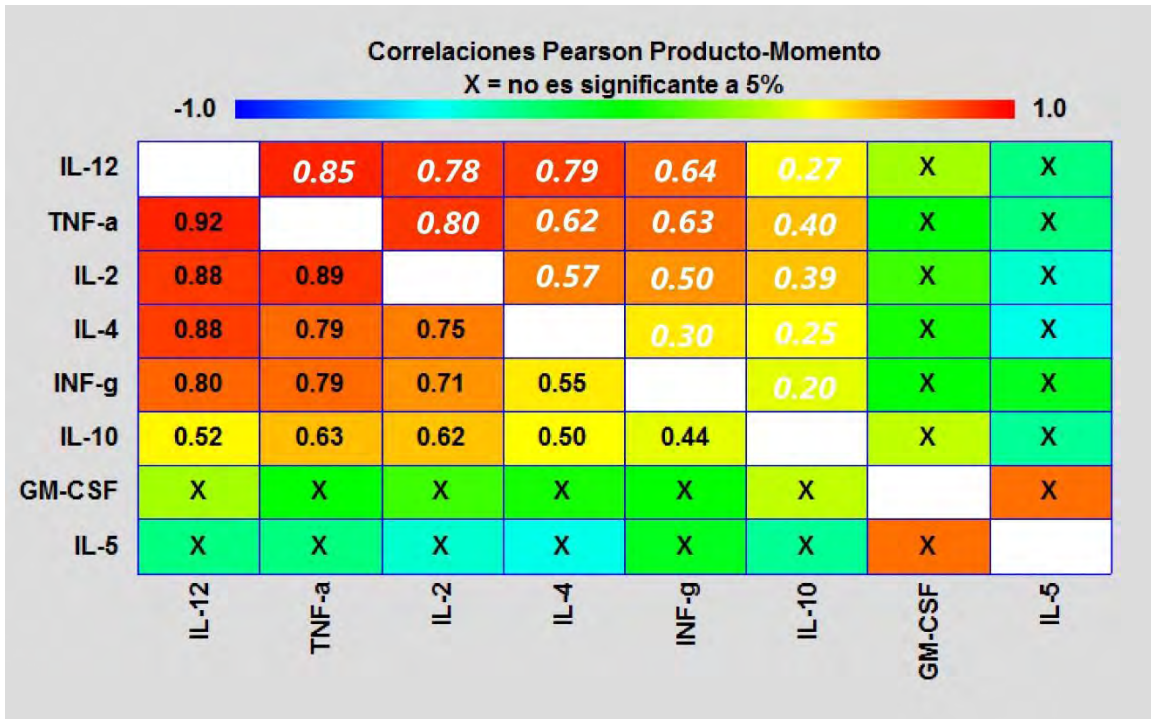
## 9.9 Perfil inmunológico (Th1/Th2)

El análisis de las diferentes proteínas (IL-2, 4, 5, 10, 12, GM-CSF, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) (Figura 27 A-H) no evidenció diferencias, excepto en IL-12 e INF- $\gamma$ , en los grupos S+Adj que estuvieron expuestos a AF o PM2.5 (Figura 27 E-F). Para evidenciar el grado de asociación realizamos el análisis multivariado, el cual demostró una fuerte asociación entre algunos pares mostrados. Este análisis mostró diferencias significativas y correlaciones de  $r < 0.50$  en todos los pares, excepto en GM-CSF e IL-5. En los pares de la respuesta Th1 y Th2, la  $r^2$  mostró que el 30% (INF- $\gamma$  e IL-4), 27% (TNF- $\alpha$  e IL-10), 20% (INF- $\gamma$  e IL-10) y el 62% (TNF- $\alpha$  e IL-4) de los cambios que ocurren en las citocinas Th1 se deben a las transformaciones que ocurren en la respuesta Th2. En algunos casos el error de correlación entre ellos oscila entre el 38 y 80%. Asimismo, los pares Th1 y Th2, TNF- $\alpha$  e IL-12, INF- $\gamma$  e IL-12 mostraron que el 85% y 64% de las transformaciones ocurren por sus asociaciones entre ellas (Figura 28). En el caso del análisis de proporciones para INF- $\gamma$ :IL-4 y TNF- $\alpha$ :IL-10, solo la primera proporción (INF- $\gamma$ :IL-4) mostró diferencias significativas S+Adj+AF Vs S+Adj+PM2.5, es decir el último grupo experimental mantiene una respuesta para el perfil Th2 más marcada y debida a la exposición del PM2.5 (Figura 29 A). En el caso de la proporción TNF- $\alpha$ :IL-10 no mostró diferencias significativas (Figura 29 B).

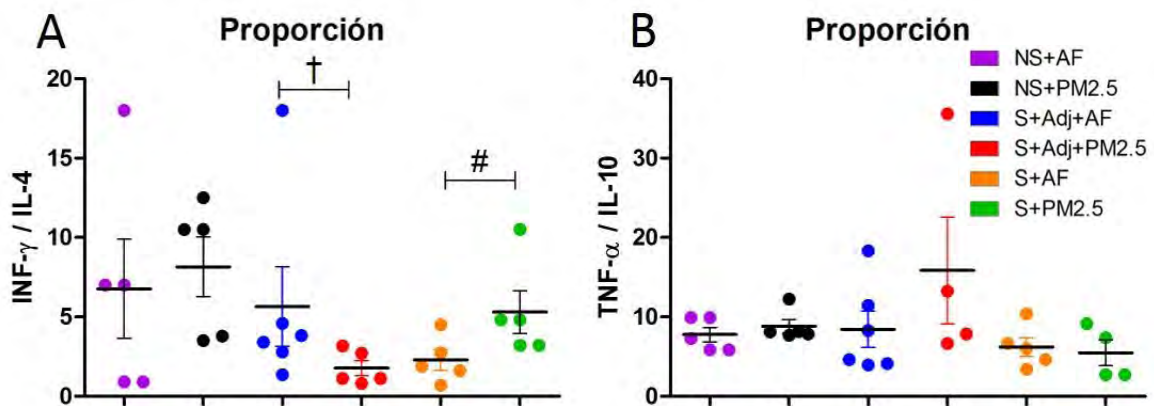


**Figura 27.** Ensayo Bio-plex. Ninguna citocina mostró cambios en los grupos a excepción de la IL-12 e INF- $\gamma$  que fue diferente del grupo S+Adj+PM2.5 y de su respectivo grupo control (†† $p < 0.01$  Vs S+Adj+AF). Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t* de Student..





**Figura 28.** Matriz de correlación de citocinas en lavados bronco-alveolares. El color rojo muestra una asociación cercana a 1, mientras que el color verde o azul muestra la ausencia de correlaciones o correlaciones negativas (0 a -1). Algunos pares de correlación no fueron significativos (X) al 5%. Los valores en color negro representan la  $r$  y los números en blanco refieren a la  $r^2$ .

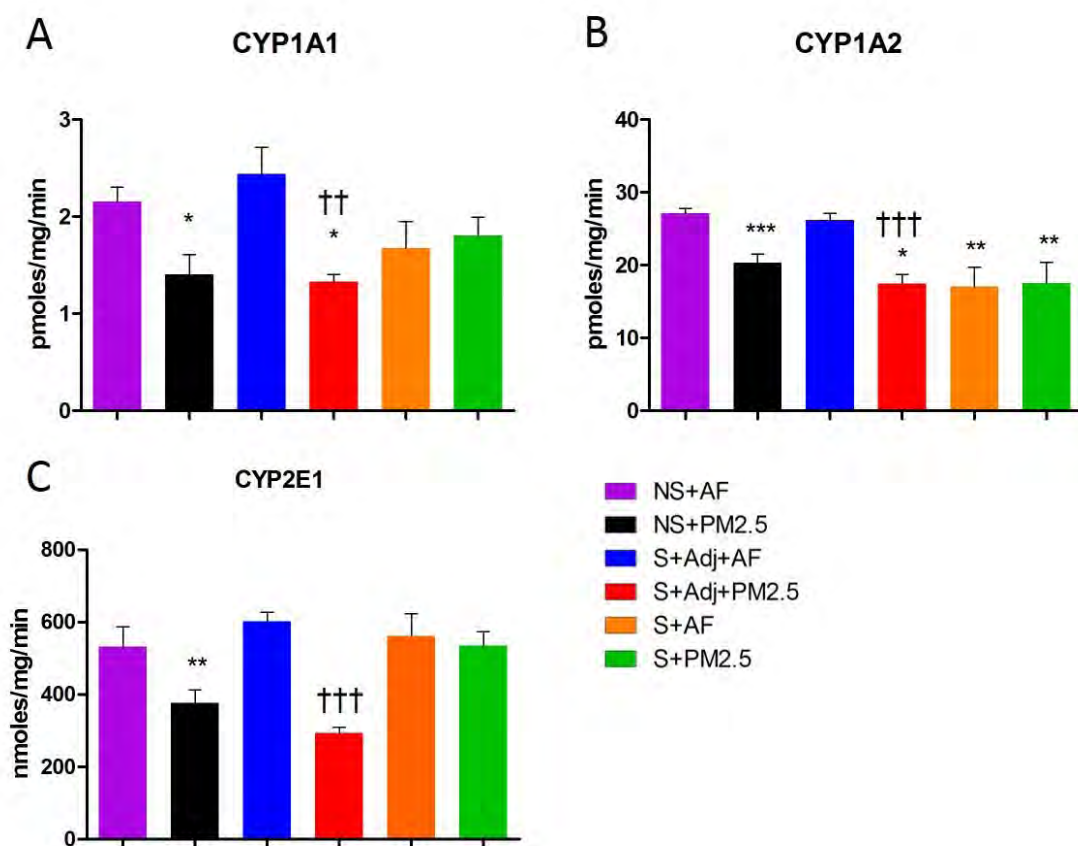


**Figura 29.** Proporción  $INF-\gamma:IL-4$  y  $TNF-\alpha:IL-10$ . A) La proporción  $INF-\gamma:IL-4$  para respuesta Th1/Th2 mostró diferencias en los grupos S+Adj+PM2.5 y S+PM2.5 ( $\dagger p < 0.05$  Vs NS+AF;

#p<0.05 Vs S+AF). B) En contraste, la proporción TNF- $\alpha$ :IL-10 no mostró cambios significativos. Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t de Student*.

## 9.10 Metabolismo pulmonar de xenobioticos

Este análisis mostró que las partículas en dos de los grupos disminuyen la actividad, tanto el grupo NS+PM2.5 y S+Adj+PM2.5 disminuyeron significativamente su actividad en comparación de sus contrapartes. Sin embargo, esto no ocurrió en el grupo S+PM2.5, ya que mostró la misma actividad que su grupo control S+AF (Figura 30).



**Figura 30.** Ensayo de actividad para las isoformas CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1.

La actividad mostró que los grupos que estuvieron expuestos a PM2.5 como NS y S+Adj redujeron las tres actividades y fueron significativo con respecto a sus grupos controles A) (\*p<0.05 Vs NS+AF; ††p<0.01 Vs S+Adj+AF). B) (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 Vs NS+AF

y ††p<0.01 Vs S+Adj+AF). C) (\*\*p<0.01 Vs NS+AF; †††p<0.001 Vs S+Adj+AF). Todos los análisis fueron realizados utilizando una *t de Student* y ANOVA (tukey).

## 10 DISCUSIÓN

En nuestra investigación, la evaluación de diferentes parámetros pulmonares evidenció que el PM2.5 de la Ciudad de México en el modelo de asma alérgica en cobayo funcionó como un adyuvante, favoreciendo el proceso de sensibilización alérgica. Otros estudios han evaluado el comportamiento del PM en modelos animales en rata y ratón. Sin embargo, una ventaja de esta investigación fue el uso de animales como el cobayo, ya que reproduce las características principales del asma como la hiperreactividad, respuesta inflamatoria y bronco-obstrucción reversible, es decir, representa un buen modelo para evaluar el asma alérgica.

Nuestros resultados de la evaluación fisiológica mediante la pletismografía barométrica demostraron que la exposición a PM2.5 induce hiperreactividad severa en el grupo de animales S+Adj+PM2.5, mientras que en los animales sensibilizados solamente a OVA (S) incrementó el índice de bronco-obstrucción. Estudios previos en el modelo de ratón de asma alérgica han demostrado que la exposición aguda a DEP (Hao et al., 2003) o SRM (Material de referencia estándar, por sus siglas en inglés) PM1648 incrementa el PENH de manera dosis-dependiente (Archer et al., 2004). Lo mismo ocurrió con la instilación de TiO<sub>2</sub> (Dióxido de titanio) sugiriendo que dentro de SRM PM1648 hay elementos o compuestos responsables de la hiperreactividad de la vía aérea (Archer et al., 2004). Además, evidenciamos que las PM2.5 en el grupo sensibilizado solamente con OVA (S+PM2.5) incrementó ambos anticuerpos IgG1 e IgE OVA-específicos, siendo diferente de su control S+AF. Este resultado podría ser explicado con algunos estudios de sensibilización en cobayos, los cuales incrementan los anticuerpos OVA-específicos IgG1 e IgE en suero cuando es administrado el antígeno OVA y su adyuvante, mientras que la administración solo del antígeno incrementa únicamente los niveles del anticuerpo IgE OVA-específico (Andersson, 1980). Por lo tanto, en los animales sensibilizados



a OVA solamente, las PM2.5 (grupo S+PM2.5) funcionaron como un adyuvante ya que los niveles de ambos anticuerpos se elevaron, favoreciendo el proceso de sensibilización alérgica. En ratones sensibilizados se ha evidenciado que la instilación intranasal de OVA+PM2.5 afectan los niveles de los anticuerpos IgG1, IgG2 e IgE específicos para OVA más que la fracción gruesa (Steerenberg et al., 2006). Incluso, las partículas DEP también son capaces de incrementar los niveles de los anticuerpos IgG1 e IgE (Hao et al., 2003). Estas partículas han sido ampliamente estudiadas y se ha demostrado el efecto adyuvante, el cual se conoce desde la década de 1980 (Muranaka et al.), sin embargo el efecto de las PM es relativamente nuevo. Li et al., (2009) reportaron un gran incremento de ambos anticuerpos cuando los animales son sensibilizados a OVA y expuestos a partículas ultra finas, en comparación con aquellos animales, a los cuales solo se les administró la sensibilización con OVA (Li et al., 2009). Este resultado difiere de esta investigación, ya que nuestros grupos S+Adj que inhalaban aire filtrado (S+Adj+AF) o PM2.5 (S+Adj+PM2.5) mostraron los mismos niveles de ambos anticuerpos evaluados. Este resultado podría ser explicado por el tipo de exposición, ya que los animales en este experimento fueron expuestos de manera aguda al PM2.5.

Por otro lado, encontramos que el anticuerpo no específico IgG mantiene los mismos niveles en todos los grupos. Interesantemente se demostró que la exposición a compuestos biogénicos como las endotoxinas, pueden incrementar los niveles de IgG, pero por sí solo el glucano o la mezcla de endotoxinas + glucano no producen cambio alguno en los niveles de este anticuerpo (Thorn et al., 1998), tal como ocurrió con los niveles de IgG inespecífica de los animales de este experimento. Una característica del asma o el proceso de sensibilización además de la IgE e IgG1, es la presencia de eosinófilos (Foster et al., 1996). Sin embargo, en nuestro estudio el grupo S+Adj+PM2.5 no solo incrementó este tipo celular, sino también los neutrófilos, lo cual podría explicar la respuesta severa después del reto al antígeno (OVA). Resultados similares en el modelo de sensibilización en ratón mediante la administración intranasal de OVA+PM recolectado en cinco ciudades europeas (Roma, Oslo, Ámsterdam, Zilk y Lodz), evidenciaron el efecto adyuvante

y el incremento en el número de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos en lavado bronco-alveolares. Siendo el PM de Lodz el de mayor efecto adyuvante y de daño pulmonar (Steerenberg et al., 2005). La exposición del PM de todas las ciudades incrementó el número de macrófagos en el BAL. Además, Li et al. (2009) and Farraj et al. (2006) utilizaron partículas ultra finas (DEP) más OVA en este mismo modelo, el cual elevó el número de células mononucleares (Li et al., 2009), y eosinófilos (Farraj et al., 2006). El eosinófilo aparece frecuentemente y está relacionado con las exacerbaciones asmáticas, mientras que el aumento de los neutrófilos es responsable de la limitación de flujo aéreo severo (Lee et al., 2014), el cual está asociado a asma fatal. Este efecto fue observado durante el ensayo pletismográfico, ya que el grupo S+Adj+PM2.5 respondió más rápido después del reto a OVA, además presentó mayor daño pulmonar evidenciado con los niveles de la proteína CC16 más que su grupo control S+Adj+AF. Algunos irritantes como los contaminantes atmosféricos pueden inducir daño pulmonar e incremento de la proteína CC16. Un estudio en humanos correlacionó el incremento de la proteína CC16 en 0.52  $\mu\text{g/L}$  en suero por cada incremento de 5  $\mu\text{g/m}^3$  de PM10 (Provost et al., 2014). Ésta proteína protege el tracto respiratorio en contra del estrés oxidante e inflamación (Broeckeaert 2000). Adicionalmente, los humo, ozono y el PM pueden alterar la integridad y la permeabilidad del epitelio bronquiolar o bronquial, aumentando el proceso de sensibilización (Broeckeaert, 2000) y la hiperreactividad pulmonar.

Otro cambio importante en el asma es la metaplasia y displasia de células mucoproducidas, es decir la aparición de células mucoproducidas en el epitelio bronquial o bronquiolar o el incremento en número de estas, las cuales están relacionadas al aumento en la obstrucción de la vía aérea e incremento de las exacerbaciones (Reader et al., 2003). Este evento se agudizó cuando los animales inhalaban partículas, ya que los grupos NS+PM2.5, S+Adj+PM2.5 y S+PM25 incrementaron el porcentaje de células mucoproducidas en el bronquiolo pulmonar, sitio que carece de este tipo celular. Este mismo resultado fue reportado por Li et al., (2009), el cual incrementó el número de células mucoproducidas cuando los

animales sensibilizados fueron expuesto a irritantes como las partículas ultra finas. En los bronquiolos pulmonares, los altos niveles de la proteína CC16 pueden originar cambios hacia fenotipo muco-productor (Evans et al., 2004). Otro componente importante es la proteína elastasa de los neutrófilos, ya que interviene en la degranulación de las células productoras de moco (Agusti et al., 1998). Tanto la metaplasia mucoide como la degranulación podrían incrementar la obstrucción en las vías respiratorias en este modelo animal. La inhalación aguda en este modelo no produjo cambios pulmonares como fibrosis por incremento de fibras de colágena, ya que este tipo de cambio solo aparecen cuando los organismos están expuestos crónicamente o altas concentraciones de material particulado (Decolgne et al., 2010).

Nuestro estudio evidenció el papel adyuvante similar al  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , por parte del  $\text{PM}_{2.5}$  de la Ciudad de México.  $\text{Al}(\text{OH})_3$  fue un excelente adyuvante en nuestro modelo experimental ya que, si no es administrado, los animales nunca producirán síntomas de asma como ocurrió en el grupo S+AF. Este adyuvante está asociado a la respuesta de tipo Th2 en la inmunoterapia alérgica, es decir, participa en la producción de IL-4, IL-5 y de anticuerpos específicos como IgG1 (Brewer et al., 1999). Además, causa inflamación y produce estrés oxidante, el cual puede generar más ROS (Especies Reactivas de Oxígeno, por sus siglas en inglés) cuando el Al es combinado con otros metales como el Fe, produciendo la reducción de Fe III a Fe II y la auto-oxidación del primero (Exley et al., 2010b). Aunque, también las células inflamatorias reclutadas son una fuente importante en la formación de ROS dentro de la vía aérea (Dworski, 2000). Otro metal, tal como el Níquel (Ni), también puede funcionar como un potente inductor de asma alérgica, afecta el proceso inicial y subsecuente desarrollo alérgico e incremento en la producción de IgE (Gilmour et al., 2000).

Después de la inhalación de  $\text{PM}_{2.5}$ , observamos cambios severos en el grupo S+Adj, probablemente debido  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Además, el efecto adyuvante que mostró el grupo S, podría estar relacionado a los componentes metálicos de las

partículas finas, funcionando como el adyuvante indispensable similar al  $\text{Al}(\text{OH})_3$  para resultar en cambios de tipo asmáticos. Adicionalmente, el Silicio (Si) que encontramos en nuestros análisis de inorgánicos, el cual podría estar representado como partículas mesoporosas de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y cuya administración ha demostrado el efecto adyuvante en el modelo sensibilización a través de OVA en ratones (Mahony et al., 2013).

Igualmente, los estudios de PAHs también han demostrado un alto poder oxidante y formación de ROS (Li et al., 2009). Las DEP están formadas por una gran cantidad de compuesto orgánicos y se conoce su potencial ya que promueven la expresión de respuesta inmunológica Th2, es decir, para fenotipo alérgico (Pandya et al., 2002). Dentro de los compuesto capaces de incrementar este tipo de respuesta alérgico, encontramos especialmente el antraceno, fluorantreno, benzo (a) pireno (Kano et al., 1997), y el fenantreno (Tsien et al., 1997). En nuestro análisis de PAH encontramos que el concentrado de partículas que inhalaron los animales tenía concentraciones elevadas de fenantreno, fluorantreno y la mayoría de los compuestos del benzo fluroantreno, benzo pireno y benzo perileno. Además, la producción de ROS se incrementa por la inflamación crónica de la vía aérea, entre las que participan los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y las células del epitelio (Li et al., 2003). Los neutrófilos y las células mononucleares de pacientes asmáticos generan más  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  que las células de personas sanas, esta actividad presentó correlación con la hiperreactividad bronquial inducida con metacolina. Asimismo, las DEP o PM pueden inducir MAP cinasa y factores nucleares como NF- $\kappa$ B. Esta activación juega un papel importante en la transcripción de citocinas implicadas en la adhesión de moléculas para la inducción de la inflamación, producción y liberación de las interleucinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 y VCAM-1. Estos productos pro-inflamatorios actúan sinérgicamente induciendo la respuesta Th2 (Li et al., 2003).

Por otra parte, el ensayo de respuesta Th1/Th2 del ensayo Bio-plex no mostró diferencias significativas, a excepción de las proteínas IL-12 y el INF- $\gamma$  que presentaron diferencias significativas en los grupos S+Adj+PM2.5 comparado con

su grupo control que inhaló aire filtrado (S+Adj+AF). Además, el análisis de la proporción Th1/Th2 solo evidenció diferencias significativas en el par INF- $\gamma$ :IL-4. Los animales que inhalaron PM2.5 como el grupo S+Adj mostraron una tendencia hacia la respuesta Th2 en comparación con su grupo control (S+Adj+AF). Cabe mencionar que la placa utilizada fue para ratón y no para cobayo. Sin embargo, un estudio previo evaluó las concentraciones de citocinas en el modelo de osteoartritis inducida con OVA en cobayo, utilizando una placa de Bio-plex para ratón de 18 citocinas. El resultado evidenció que el rango de los valores obtenidos en estas muestras fue consistentemente más bajo que los obtenidos con las muestras de ratón. Además, 16 de las 18 citocinas analizadas fueron detectables, es decir, los niveles de IL-1 e IL-4 estuvieron por debajo del límite de detección en el líquido sinovial de las articulaciones de rodilla de los cobayos (Huebner et al., 2006). Los resultados obtenidos en el análisis multivariado correlacionaron positivamente, sin embargo, el 38% (TNF- $\alpha$  e IL-4), 60% (TNF- $\alpha$  e IL-10), 70% (INF- $\gamma$  e IL-4) y el 80% (INF- $\gamma$  e IL-10) de los datos no fueron explicados mediante las correlaciones. Es decir, probablemente las proteínas de la respuesta Th1 incrementaron mientras que las proteínas de la respuesta Th2 disminuyeron o viceversa, mostrando el interruptor Th1/Th2. En un estudio realizado en niños asmáticos de San Juan, Puerto Rico, el cual evidenció la asociación en 9 pares en más del 60% en una placa de bioplex. La correlación INF- $\gamma$  e IL-4 mostró el 31% y TNF- $\alpha$  e IL-10 el 47% de asociación, por lo tanto, el 69% y 53% no siguió este patrón, respectivamente. Este resultado es similar al que se encontró en esta investigación. Además, los resultados se asociaron de manera significativa cuando el sitio de residencia de los niños se encontraba más cerca de las carreteras y con el incremento en los niveles en plasma de IL-31 T(Th2) e IL-17 (Th17) principalmente (Rosser et al., 2016).

Con respecto al análisis del ensayo de actividad para CYP450, el cual disminuyó en los animales sensibilizados (S+Adj) o no sensibilizados (NS) cuando inhalaron PM2.5, a pesar de la presencia de PAH dentro de la composición PM2.5 que inhalaron. Es conocido que los PAHs incrementan la actividad de algunas isoformas de CYP450 como el CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 (Iwanari et al., 2002),

sin embargo, los metales disminuyen la actividad y el efecto carcinogénico de los PAHs por la inhibición de la bioactivación de CYP1A1 y CYP1A2 (Vakharia et al., 2001). Se conoce que algunos metales como el mercurio (Hg), cadmio (Cd), níquel (Ni), vanadio (V) en compuesto como metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) administrados solos o en una mezcla con PAHs como el TCDD (2, 3, 7, 8 tetraclorodibenzeno p-dioxina) inhiben la actividad de las isoformas mencionadas anteriormente (Anwar-Mohamed et al., 2008; Anwar-Mohamed et al., 2009; İşcan et al., 2002). Además, en cobayos inyectados (s.c.) con arsenito de sodio (75mmol/kg) mostró que inhibe la actividad del CYP1A1. Adicionalmente, la administración conjunta de este compuesto más  $\beta$ -naftoflavona (inductor del CYP1A1) disminuye la actividad renal y hepática de CYP1A1 (Falkner et al., 1993). Además, la formación de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por exposición a metales puede activar a NF- $\kappa$ B e inhibir al complejo AhR-XAP2 y disminuir la actividad de CYP450 (Ioannides, 2008). Otro proceso que disminuye la actividad del CYP450 en humanos y animales es la respuesta inflamatoria e infecciones, las cuales causan cambios en la expresión y actividad de varias isoformas de CYP450 en hígado y en tejidos extra hepáticos como riñón y cerebro (Morgan, 2001). Se demostró que la inyección de lipopolisacáridos (LPS) en el ventrículo cerebral suprime la actividad CYP1A (Morgan, 2001) y las infecciones, principalmente por virus también están asociadas a la disminución de la actividad del CYP2A6 (Morgan, 2001). Los LPS son capaces de desregular la expresión inductora de xenobióticos de los genes del CYP representativos e incrementan los niveles de RNAm de citocinas pro-inflamatorias producidas por el macrófago como TNF- $\alpha$  e IL-1, además desregulan el CYP1A2 en eventos de sepsis (Moriya et al., 2014). Sin embargo, otro estudio demostró que tanto la administración de LPS como de OVA en un modelo de inflamación sistémica incrementa TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , pero la actividad de las diferentes isoformas del CYP450 evaluadas no cambió en los animales sensibilizados con OVA, es decir, el modelo de sensibilización o de inflamación sistémica no inhibe la función de los CYP1A2 o CYP3A (Moriya et al., 2014). Este resultado sustenta los hallazgos presentados en este estudio, ya que los animales S+Adj+AF no mostraron diferencias en comparación con su grupo control (NS+AF).

Otro evento importante por el cual los CYP450 pueden estar regulados es la hipoxia. Cuando los animales están sometidos a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> o en ellos hay alguna obstrucción mecánica del aire hacia los pulmones se sintetiza el factor de hipoxia inducible 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). La hipoxia modifica una serie de proteínas del citocromo P450 hepático, el cual está ligado con mediadores inflamatorios como el INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-2, y a su vez éstos son responsables de la disminución de la actividad y la expresión de algunas isoformas del CYP450 (Fradette et al., 2004). Por otro lado, el HIF-1 $\alpha$  puede formar el dímero con el ARNT (Translocador del receptor de hidrocarburos aromáticos) en lugar de formar el dímero común con el AHR; AHR-ARNT (Ioannides, 2008). De esta manera el mecanismo hipotético es la formación del dímero ARNT-HIF-1 $\alpha$ , el cual inhibe la síntesis de isoformas relacionadas al AHR como CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. Sin embargo, nuestro grupo S+Adj+AF no disminuyó la actividad de CYP1A1/2 aunque presentó alto índice de PENH. Asimismo, el CYP2E1 está regulado por una serie de elementos inflamatorios los cuales pueden activar esta isoforma como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 (Ioannides, 2008), sin embargo, ninguna de las isoformas evaluadas en éste estudio disminuyó, a pesar de la inflamación en nuestro modelo.

Por lo anterior, el evento de bronco obstrucción e inflamación presentado por los animales de este experimento no fue capaz de modificar la actividad del citocromo P450 sino que probablemente la composición del PM<sub>2.5</sub> estaría jugando un papel más importante en la disminución de la actividad de estas proteínas como lo ocurrido en estos resultados. El PM está formado por metales, no metales, elementos de transición interna, PAH y aerobiológicos. Esta gran mezcla presente en el PM produce estrés oxidante y activar respuestas inflamatorias específicas como el tipo Th2 dentro de los pulmones en inhalaciones agudas en el modelo de asma.

## 11 CONCLUSIÓN

Nuestro estudio demostró que las partículas finas actúan como adyuvantes, produciendo asma alérgica en el modelo de cobayos, ya que han sido sensibilizados con ovoalbúmina en ausencia de un adyuvante. Además, en animales sensibilizados con ovoalbúmina más el adyuvante como el  $Al(OH)_3$ , la inhalación de partículas finas empeoró la bronco-constricción, la inflamación de la vía aérea y el daño pulmonar. Las partículas finas de la Ciudad de México son una compleja mezcla de compuestos que modifican el proceso de detoxificación dentro de pulmón. Es crucial precisar que elementos y compuestos químicos juegan un papel adyuvante en el proceso de sensibilización y el desarrollo de asma alérgica. Además, dos de los eventos que presenta el modelo de asma como son la broncoobstrucción y la inflamación no alteraron la actividad de CYP450, sino que la composición del PM está jugando un papel sumamente importante en la modulación de este sistema de enzimas que evaluamos (CYP1A1/1A2 y CYP2E1). Es indispensable continuar con el análisis de las partículas de la Ciudad de México sobre los cambios que producen en los pulmones, especialmente en las enfermedades alérgicas como es el caso del asma.



## 12 LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K. (2012). *Inmunología Celular Y Molecular*. Elsevier.
- Adelman, D. C., Casale, T. B., & Corren, J. (2005). *Alergia e Inmunología*: Marbán.
- Agusti, C., Takeyama, K., Cardell, L. O., Ueki, I., Lausier, J., Lou, Y.P., & Nadel, J. A. (1998). Goblet Cell Degranulation after Antigen Challenge in Sensitized Guinea Pigs: Role of Neutrophils. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(4), 1253-1258.
- Alessandrini, F., Weichenmeier, I., Van Miert, E., Takenaka, S., Karg, E., Blume, C., . . . Behrendt, H. (2010). Effects of Ultrafine Particles-Induced Oxidative Stress on Clara Cells in Allergic Lung Inflammation. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 1.
- Alves, C. A., Urban, R. C., Pegas, P. N., & Nunes, T. (2014). Indoor/Outdoor Relationships between Pm10 and Associated Organic Compounds in a Primary School. *Aerosol and Air Quality Research*, 14, 86-98.
- Amador-Muñoz O., Vázquez Santiago J., Jazcilevich-Diamant A., Santos-Medina G.L., & B.L., V.-H. (2014). *Dispositivo Integrado Por Múltiples Deflexiones Para La Recuperación De Compuestos Orgánicos Debido a La Evaporación De Disolventes Orgánicos Por Arrastre De Vapor*. (Vol. 325625). México.
- Andersson, P. (1980). Antigen-Induced Bronchial Anaphylaxis in Actively Sensitized Guinea-Pigs: Anti Anaphylactic Effects of Sodium Cromoglycate and Aminophylline. *British Journal of Pharmacology*, 69(3), 467-472.
- Anwar-Mohamed, A., & El-Kadi, A. O. (2008). Down-Regulation of the Carcinogen-Metabolizing Enzyme Cytochrome P450 1a1 by Vanadium. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(9), 1819-1827.
- Anwar-Mohamed, A., Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2009). Regulation of Cyp1a1 by Heavy Metals and Consequences for Drug Metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 5(5), 501-521.
- Archer, A. J., Cramton, J. L., Pfau, J. C., Colasurdo, G., & Holian, A. (2004). Airway Responsiveness after Acute Exposure to Urban Particulate Matter 1648 in a Do11. 10 Murine Model. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(2), L337-L343.
- Barnes, P. (2007). Fisiopatología Del Asma. In J. D. Crapo, Glassroth Jeffrey., J. Karlinsky & E. T. King (Eds.), *Neumología De Baum's* (7 ed.). Philadelphia, PA. USA: Marbán.
- Barnes, P. J. (2001). Th2 Cytokines and Asthma: An Introduction. *Respir Res*, 2(2), 64-65.
- Barnes, P. J. (2008). The Cytokine Network in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3546-3556. doi: 10.1172/JCI36130
- Bolton, S., Pinnion, K., Marshall, C., Wilson, E., Barker, J., Oreffo, V., & Foster, M. (2008). Changes in Clara Cell 10 Kda Protein (Cc10)-Positive Cell Distribution in Acute Lung Injury Following Repeated Lipopolysaccharide Challenge in the Rat. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 440-448.

- Bonner, J. C. (2007). Lung Fibrotic Responses to Particle Exposure. *Toxicology Pathology*, 35(1), 148-153. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/01926230601060009>
- Bousquet, J., Bousquet, P. J., Godard, P., & Daures, J.-P. (2005). The Public Health Implications of Asthma. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(7), 548-554.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brauer, M., Hoek, G., Van Vliet, P., Meliefste, K., Fischer, P. H., Wijga, A., . . . Brunekreef, B. (2002). Air Pollution from Traffic and the Development of Respiratory Infections and Asthmatic and Allergic Symptoms in Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(8), 1092-1098. doi: 10.1164/rccm.200108-007OC
- Brewer, J. M., Conacher, M., Hunter, C. A., Mohrs, M., Brombacher, F., & Alexander, J. (1999). Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of Il-4-or Il-13-Mediated Signaling. *Journal of Immunology*, 163(12), 6448-6454.
- Broeckaert, B. (2000). Clara Cell Secretory Protein (CC16): Characteristics and Perspectives as Lung Peripheral Biomarker. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(4), 469-475. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00760.x
- Calderon-Garciduenas, L., Franco-Lira, M., Torres-Jardon, R., Henriquez-Roldan, C., Barragan-Mejia, G., Valencia-Salazar, G., . . . Reed, W. (2007). Pediatric Respiratory and Systemic Effects of Chronic Air Pollution Exposure: Nose, Lung, Heart, and Brain Pathology. *Toxicologic Pathology*, 35(1), 154-162. doi: 10.1080/01926230601059985
- Castell, J.V., Donato, M.T., Gómez-Lechón. M. J. (2005). Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental Toxicology Pathology*, 57, 189-204.
- Cox, S. (2016). *Animal Model in Toxicology*. USA: CRC Press.
- Decologne, N., Wettstein, G., Kolb, M., Margetts, P., Garrido, C., Camus, P., Bonniaud, P. (2010). Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J*, 35, 176-185. doi 10.1183/09031936.00181808
- Chung, K., & Barnes, P. (1999). Cytokines in Asthma. *Thorax*, 54(9), 825-857.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., . . . Garçon, G. (2015). Temporal-Spatial Variations of the Physicochemical Characteristics of Air Pollution Particulate Matter (Pm2.5-0.3) and Toxicological Effects in Human Bronchial Epithelial Cells (Beas-2b). *Environmental Research*, 137(0), 256-267. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>
- Diaz-Sanchez, D., Garcia, M. P., Wang, M., Jyrala, M., & Saxon, A. (1999). Nasal Challenge with Diesel Exhaust Particles Can Induce Sensitization to a Neoallergen in the Human Mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(6), 1183-1188.
- Dworski, R. (2000). Oxidant Stress in Asthma. *Thorax*, 55(suppl 2), 51-53.

- Edgerton, S. A., Bian, X., Doran, J. C., Fast, J. D., Hubbe, J. M., Malone, E. L., . . . Petty, R. (1999). Particulate Air Pollution in Mexico City: A Collaborative Research Project. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 49(10), 1221-1229. doi: 10.1080/10473289.1999.10463915
- Espinosa, A., Reyes-Herrera, J., Miranda, J., Mercado, F., Veytia, M., Cuautle, M., & Cruz, J. (2012). Development of an X-Ray Fluorescence Spectrometer for Environmental Science Applications. *Instrumentation Science and Technology*, 40(6), 603-617.
- Evans, C. M., Williams, O. W., Tuvim, M. J., Nigam, R., Mixides, G. P., Blackburn, M. R., . . . Reynolds, S. D. (2004). Mucin Is Produced by Clara Cells in the Proximal Airways of Antigen-Challenged Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31(4), 382-394.
- Exley, C. (2014). Aluminium Adjuvants and Adverse Events in Sub-Cutaneous Allergy Immunotherapy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 10(1), 1.
- Exley, C., Siesjö, P., & Eriksson, H. (2010). The Immunobiology of Aluminium Adjuvants: How Do They Really Work? *Trends in immunology*, 31(3), 103-109.
- Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I., & Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Falcón-Rodríguez, C. I. (2012). *Caracterización De Los Diferentes Subtipos De La Célula Bronquiolar No Ciliada En El Modelo Murino De Inhalación De Vanadio*. (Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. Retrieved from <http://132.248.9.195/ptd2013/Presenciales/0689326/Index.html>
- Falkner, K. C., McCallum, G. P., Cherian, M. G., & Bend, J. R. (1993). Effects of Acute Sodium Arsenite Administration on the Pulmonary Chemical Metabolizing Enzymes, Cytochrome P-450 Monooxygenase, Nad (P) H: Quinone Acceptor Oxidoreductase and Glutathione S-Transferase in Guinea Pig: Comparison with Effects in Liver and Kidney. *Chemico-Biological Interactions*, 86(1), 51-68.
- Farrar, A. K., Haykal-Coates, N., Ledbetter, A. D., Evansky, P. A., & Gavett, S. H. (2006). Neurotrophin Mediation of Allergic Airways Responses to Inhaled Diesel Particles in Mice. *Toxicology Science*, 94(1), 183-192.
- Flenley, D. (1986). Reversible Airway Obstruction: Neurohumoral Mechanisms and Treatment. *Respiration*, 50(2), 57-64.
- Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., & Young, I. G. (1996). Interleukin 5 Deficiency Abolishes Eosinophilia, Airways Hyperreactivity, and Lung Damage in a Mouse Asthma Model. *Journal of Experimental Medicine*, 183(1), 195-201.
- Fradette, C., & Souich, P. d. (2004). Effect of Hypoxia on Cytochrome P450 Activity and Expression. *Current Drug Metabolism*, 5(3), 257-271.
- García-Sancho, C., Fernández-Plata, R., Martínez-Briseño, D., Franco-Marina, F., & Pérez-Padilla, J. R. (2012). Prevalencia Y Riesgos Asociados Con Pacientes Adultos Con Asma De 40 Años O Más De La Ciudad De México: Estudio De Base Poblacional. *Salud Pública de México*, 54(4), 425-432.

- Garimella, S., & Deo., R. N. (2007). Neutron Activation Analysis of Atmospheric Aerosols from a Small Pacific Island Country: A Case of Suva, Fiji Islands. *Aerosol and Air Quality Research*, 7(4), 500-517.
- Gehring, U., Wijga, A. H., Brauer, M., Fischer, P., de Jongste, J. C., Kerkhof, M., . . . Brunekreef, B. (2010). Traffic-Related Air Pollution and the Development of Asthma and Allergies During the First 8 Years of Life. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(6), 596-603.
- Gerlofs-Nijland, M. E., Boere, A. J. F., Leseman, D. L., Dormans, J. A., Sandström, T., Salonen, R. O., . . . Cassee, F. R. (2005). Effects of Particulate Matter on the Pulmonary and Vascular System: Time Course in Spontaneously Hypertensive Rats. *Particle and Fibrer Toxicology*, 2(1), 1.
- GINA. (2016). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Retrieved 040816, 2016, from <http://ginasthma.org/2016-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
- Gilmour, M., Selgrade, M. and Lambert, A. 2000. Enhanced allergic sensitization in animals exposed to particulate air pollution. *Inhal Toxicol*, 12, 373-380.
- Gómez-Lechón, M. J., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., . . . Guguen-Guillouzo, C. (2001). Expression and Induction of a Large Set of Drug-Metabolizing Enzymes by the Highly Differentiated Human Hepatoma Cell Line Bc2. *European Journal of Biochemistry*, 268(5), 1448-1459.
- Gruzieva, O., Bellander, T., Eneroth, K., Kull, I., Melén, E., Nordling, E., . . . Hulchiy, O. (2012). Traffic-Related Air Pollution and Development of Allergic Sensitization in Children During the First 8 Years of Life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), 240-246.
- Gruzieva, O., Gehring, U., Aalberse, R., Agius, R., Beelen, R., Behrendt, H., . . . Fuentes, E. (2014). Meta-Analysis of Air Pollution Exposure Association with Allergic Sensitization in European Birth Cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 767-776. e767.
- Guengerich, F. P. (2003). Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Molecular Interventions*, 3(4), 194.
- Guengerich, F. P., & Shimada, T. (1991). Oxidation of Toxic and Carcinogenic Chemicals by Human Cytochrome P-450 Enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, 4(4), 391-407.
- Halatek, T., Stepnik, M., Stetkiewicz, J., Krajnow, A., Kur, B., Szymczak, W., . . . Cassee, F. R. (2011). The Inflammatory Response in Lungs of Rats Exposed on the Airborne Particles Collected During Different Seasons in Four European Cities. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(13), 1469-1481.
- Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G., Irvin, C., & Gelfand, E. (1997). Noninvasive Measurement of Airway Responsiveness in Allergic Mice Using Barometric Plethysmography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(3), 766-775.
- Hao, M., Comier, S., Wang, M., Lee, J. J., & Nel, A. (2003). Diesel Exhaust Particles Exert Acute Effects on Airway Inflammation and Function in Murine Allergen Provocation Models. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 112(5), 905-914.

- Harrison, R. M., & Yin, J. (2000). Particulate Matter in the Atmosphere: Which Particle Properties Are Important for Its Effects on Health? *Science of The Total Environment*, 249(1–3), 85-101. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00513-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00513-6)
- Huebner, J. L., & Kraus, V. B. (2006). Assessment of the Utility of Biomarkers of Osteoarthritis in the Guinea Pig. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 923-930. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2006.03.007>
- Huerta-López, J., Jiménez-Gutiérrez, C., Olmo-Téllez, H., & Maza-López, M. (2009). Remodelación De La Vía Aérea En Asma. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica*, 18, 60-78.
- INEGI. (2013a). Base De Datos Censo Poblacional 2014. 2016, from <http://www.inegi.org.mx/biinegi/>
- INEGI. (2013b). Referencias Geográficas Y Extensión Territorial De México 2016, from [http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/internet/1-GeografiaDeMexico/MAN\\_REFGEOG\\_EXTTERR\\_VS\\_ENERO\\_30\\_2088.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/internet/1-GeografiaDeMexico/MAN_REFGEOG_EXTTERR_VS_ENERO_30_2088.pdf)
- Instones, C., Ormstad, H., Rydjord, B., Wiker, H., & Hetland, G. (2004). Mould Extracts Increase the Allergic Response to Ovalbumin in Mice. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(10), 1634-1641.
- Ioannides, C. (2008). *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics*: royal society of chemistry.
- İşcan, M., Ada, A. O., Çoban, T., Kapucuoğlu, N., Aydın, A., & İşimer, A. (2002). Combined Effects of Cadmium and Nickel on Testicular Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Rats. *Biological Trace Element Research*, 89(2), 177-190.
- Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., & Yokoi, T. (2002). Induction of Cyp1a1, Cyp1a2, and Cyp1b1 Mrnas by Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Various Human Tissue-Derived Cells: Chemical-, Cytochrome P450 Isoform-, and Cell-Specific Differences. *Archives of Toxicology*, 76(5-6), 287-298.
- Kanoh, T., Suzuki, T., Ishimori, M., Ikeda, S., Ohasawa, M., Ohkuni, H., & Tunetoshi, Y. (1997). Adjuvant Activities of Pyrene, Anthracene, Fluoranthene and Benzo (a) Pyrene in Production of Anti-Ige Antibody to Japanese Cedar Pollen Allergen in Mice. *Jorunal of Clinical Laboratory. Immunology* 3, 47-61.
- Katavolos, P., Ackerley, C., Viel, L., Clark, M., Wen, X., & Bienzle, D. (2009). Clara Cell Secretory Protein Is Reduced in Equine Recurrent Airway Obstruction. *Veterinary Pathology Online*, 46(4), 604-613.
- Kawakami, T., Kashiwakura, J. I., & Kawakami, Y. (2014). Histamine-Releasing Factor and Immunoglobulins in Asthma and Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 6(1), 6-12. doi: 10.4168/air.2014.6.1.6
- Kim, D., Gautam, M., & Gera, D. (2002). Parametric Studies on the Formation of Diesel Particulate Matter Via Nucleation and Coagulation Modes. *Journal of Aerosol Science*, 33(12), 1609-1621. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-8502\(02\)00119-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-8502(02)00119-2)
- Kips, J. C. (2001). Cytokines in Asthma. *European Respiratory Journal*, 18(34 suppl), 24s-33s. doi: 10.1183/09031936.01.00229601



- Krämer, U., Koch, T., Ranft, U., Ring, J., & Behrendt, H. (2000). Traffic-Related Air Pollution Is Associated with Atopy in Children Living in Urban Areas. *Epidemiology*, *11*(1), 64-70.
- Kuipers, H., & Lambrecht, B. N. (2005). Modification of Dendritic Cell Function as a Tool to Prevent and Treat Allergic Asthma. *Vaccine*, *23*(37), 4577-4588. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.04.031
- Kuroda, E., Coban, C., & Ishii, K. J. (2013). Particulate Adjuvant and Innate Immunity: Past Achievements, Present Findings, and Future Prospects. *International Reviews of Immunology*, *32*(2), 209-220. doi: 10.3109/08830185.2013.773326
- Lee, T.-H., Song, H. J., & Park, C.-S. (2014). Role of Inflammasome Activation in Development and Exacerbation of Asthma. *Asia Pacific of Allergy*, *4*(4), 187-196. doi: <http://dx.doi.org/10.5415/apallergy.2014.4.4.187>
- Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C., & Nel, A. E. (2003). Particulate Air Pollutants and Asthma: A Paradigm for the Role of Oxidative Stress in Pm-Induced Adverse Health Effects. *Clinical Immunology*, *109*(3), 250-265.
- Li, N., Harkema, J. R., Lewandowski, R. P., W., M., Bramble, L. A., Gookin, G. R., . . . Nel, A. E. (2010). Ambient Ultrafine Particles Provide a Strong Adjuvant Effect in the Secondary Immune Response: Implication for Traffic-Related Asthma Flares. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, *299*(3), L374-L383.
- Li, N., Wang, M., Bramble, L. A., Schmitz, D. A., Schauer, J. J., Sioutas, C., . . . Nel, A. E. (2009). The Adjuvant Effect of Ambient Particulate Matter Is Closely Reflected by the Particulate Oxidant Potential. *Environmental Health Perspective*, *117*(2), 1116-1123. doi: 10.1289/ehp.0800319
- Limbeck, A., Handler, M., Puls, C., Zbiral, J., Bauer, H., & Puxbaum, H. (2009). Impact of Mineral Components and Selected Trace Metals on Ambient Pm10 Concentrations. *Atmospheric Environment*, *43*(3), 530-538. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.012>
- Lindblad, E. B. (2004). Aluminium Adjuvants—in Retrospect and Prospect. *Vaccine*, *22*(27–28), 3658-3668. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.032>
- Mahony, D., Cavallaro, A. S., Stahr, F., Mahony, T. J., Qiao, S. Z., & Mitter, N. (2013). Mesoporous Silica Nanoparticles Act as a Self-Adjuvant for Ovalbumin Model Antigen in Mice. *Small*, *9*(18), 3138-3146.
- Möbs, C., Ipsen, H., Mayer, L., Slotosch, C., Petersen, A., Würtzen, P. A., . . . Pfützner, W. (2012). Birch Pollen Immunotherapy Results in Long-Term Loss of Bet V 1–Specific Th2 Responses, Transient Tr1 Activation, and Synthesis of Ige-Blocking Antibodies. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, *130*(5), 1108-1116.e1106.
- Mora, N., Rosales, C. (2009). Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigación Clínica*, *61*(4), 313-326.
- Morgan, E. T. (2001). Regulation of Cytochrome P450 by Inflammatory Mediators: Why and How? *Drug metabolism and disposition*, *29*(3), 207-212.
- Moriya, N., Kataoka, H., Fujino, H., Nishikawa, J., & Kugawa, F. (2014). Different Expression Patterns of Hepatic Cytochrome P450 S During Anaphylactic or

- Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(2), 142-147.
- Mugica, V., Ortiz, E., Molina, L., De Vizcaya-Ruiz, A., Nebot, A., Quintana, R., . . . Alcántara, E. (2009). Pm Composition and Source Reconciliation in Mexico City. *Atmospheric Environment*, 43(32), 5068-5074. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.06.051>
- Muranaka, M., Suzuki, S., Koizumi, K., Takafuji, S., Miyamoto, T., Ikemori, R., & Tokiwa, H. Adjuvant Activity of Diesel-Exhaust Particulates for the Production of Ige Antibody in Mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77(4), 616-623. doi: 10.1016/0091-6749(86)90355-6
- Nemmar, A., Holme, J. A., Rosas, I., Schwarze, P. E., & Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent Advances in Particulate Matter and Nanoparticle Toxicology: A Review of the in Vivo and in Vitro Studies. *Biomed Research International*, 2013, 279371. doi: 10.1155/2013/279371
- Nikasinovic, L., Just, J., Sahraoui, F., Seta, N., Grimfeld, A., & Momas, I. (2006). Nasal Inflammation and Personal Exposure to Fine Particles Pm2. 5 in Asthmatic Children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1382-1388.
- Nordling, E., Berglind, N., Melén, E., Emenius, G., Hallberg, J., Nyberg, F., . . . Bellander, T. (2008). Traffic-Related Air Pollution and Childhood Respiratory Symptoms, Function and Allergies. *Epidemiology*, 19(3), 401-408.
- Oftedal, B., Brunekreef, B., Nystad, W., & Nafstad, P. (2007). Residential Outdoor Air Pollution and Allergen Sensitization in Schoolchildren in Oslo, Norway. *Clinical and Experimental Allergy*, 37(11), 1632-1640.
- Osornio-Vargas, A. R., Bonner, J. C., Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Ponce-de-León, R., . . . Rosas, I. (2003). Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico City Air Pollution Particulate Matter in Vitro Are Dependent on Particle Size and Composition. *Environmental Health Perspective*, 111(10), 1289-1293.
- Pandya, R. J., Solomon, G., Kinner, A., & Balmes, J. R. (2002). Diesel Exhaust and Asthma: Hypotheses and Molecular Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspective*, 110(1), 103-112.
- Pawankar, R. (2014). Allergic Diseases and Asthma: A Global Public Health Concern and a Call to Action. *World Allergy Organization Journal*, 7(1), 1-12. doi: DOI: 10.1186/1939-4551-7-12
- Pawankar, R., Canonica, G. W., Holgate, S. T., & Lockey, R. F. (2012). Allergic Diseases and Asthma: A Major Global Health Concern. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(1), 39-41. doi: 10.1097/ACI.0b013e32834ec13b
- Pérez-Vidal, H., Lunagómez-Rocha, M., & Acosta-Pérez, L. (2010). Análisis De Partículas Suspendidas Totales (Pst) Y Partículas Fracción Respirable (Pm10), En Cunduacán, Tabasco. *Universidad y ciencia*, 26, 151-162.
- Pérez, G. L., Maciel, B. M. M., López, J. H., Covarrubias, F. M., López, J. L., Aguilar, G., . . . Vargas, F. (2009). Prevalencia De Las Enfermedades Alérgicas En La Ciudad De México. *Revista Alergia México*, 56(3), 72-79.
- Phalen, R. F., & Phalen, R. N. (2013). *Introduction to Air Pollution Science: A Public Health Perspective* (1 ed.). Burlington: Jones & Bartlett Learning.

- Provost, E. B., Chaumont, A., Kicinski, M., Cox, B., Fierens, F., Bernard, A., & Nawrot, T. S. (2014). Serum Levels of Club Cell Secretory Protein (Clara) and Short- and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution in Adolescents. *Environment International*, 68(0), 66-70. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.011>
- Rael, E., & Lockey, R. (2011). Interleukin-13 Signaling and Its Role in Asthma. *World Allergy Organization Journal*, 4(3), 54 - 64.
- Reader, J. R., Tepper, J. S., Schelegle, E. S., Aldrich, M. C., Putney, L. F., Pfeiffer, J. W., & Hyde, D. M. (2003). Pathogenesis of Mucous Cell Metaplasia in a Murine Asthma Model. *American Journal of Pathology*, 162(6), 2069-2078. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64338-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64338-6)
- Reynolds, S. D., & Malkinson, A. M. (2010). Clara Cell: Progenitor for the Bronchiolar Epithelium. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(1), 1-4.
- Riedl, M. A. (2008). The Effect of Air Pollution on Asthma and Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 8(2), 139-146.
- Rosser, F., Forno, E., Brehm, J., Han, Y.-Y., Boutaoui, N., Colón-Semidey, A., . . . Alcorn, J. F. (2016). Proximity to a Major Road and Plasma Cytokines in School-Aged Children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*, 29(3), 111-117.
- SALPALDIA, C. S. (2008). Results. 2016, from <http://www.sapaldia.ch/en/the-sapaldia-cohort-study/results>
- Schwander, S., Okello, C. D., Freers, J., Chow, J. C., Watson, J. G., Corry, M., & Meng, Q. (2014). Ambient Particulate Matter Air Pollution in Mpererwe District, Kampala, Uganda: A Pilot Study. *Journal of Environmental Public Health*, 2014, 763934. doi: 10.1155/2014/763934
- Seinfeld, J. H., & Pandis, S. N. (2012). *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*: John Wiley & Sons.
- Smith, D. E. (2010). IL-33: A Tissue Derived Cytokine Pathway Involved in Allergic Inflammation and Asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(2), 200-208. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03384.x
- Steenberg, P., Dormans, J., Van Doorn, C., Middendorp, S., Vos, J., & Van Loveren, H. (1999). A Pollen Model in the Rat for Testing Adjuvant Activity of Air Pollution Components. *Inhalation Toxicology*, 11(12), 1109-1122.
- Steenberg, P. A., van Amelsvoort, L., Lovik, M., Hetland, R. B., Alberg, T., Halatek, T., . . . Schwarze, P. (2006). Relation between Sources of Particulate Air Pollution and Biological Effect Parameters in Samples from Four European Cities: An Exploratory Study. *Inhalation Toxicology*, 18(5), 333-346.
- Steenberg, P. A., Withagen, E. T., van Dalen, W. J., Dorma, J. A. M. A., Heisterkamp, S. H., van Loveren, H., & Cassee, F. R. (2005). Dose Dependency of Adjuvant Activity of Particulate Matter from Five European Sites in Three Seasons in an Ovalbumin–Mouse Model. *Inhalation Toxicology*, 17, 133-145. doi: 10.1080/08958370590904490
- Stripp, B. R., Sawaya, P., Luse, D., Wikenheiser, K. A., Wert, S. E., Huffman, J. A., . . . Whitsett, J. (1992). Cis-Acting Elements That Confer Lung Epithelial Cell Expression of the CC10 Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14703-14712.



- Takizawa, H. (2011). Impact of Air Pollution on Allergic Diseases. *Korean Journal of Internal Medicine*, 26(3), 262-273. doi: 10.3904/kjim.2011.26.3.262
- Thorn, J., & Rylander, R. (1998). Inflammatory Response after Inhalation of Bacterial Endotoxin Assessed by the Induced Sputum Technique. *Thorax*, 53(12), 1047-1052.
- Timonen, K., Hoek, G., Heinrich, J., Bernard, A., Brunekreef, B., De Hartog, J., . . . Peters, A. (2004). Daily Variation in Fine and Ultrafine Particulate Air Pollution and Urinary Concentrations of Lung Clara Cell Protein Cc16. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(11), 908-914.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., & Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity*, 19(5), 641-644. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00296-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00296-6)
- Tsien, A., Diaz-Sanchez, D., Ma, J., & Saxon, A. (1997). The Organic Component of Diesel Exhaust Particles and Phenanthrene, a Major Polyaromatic Hydrocarbon Constituent, Enhances Ige Production by Ige-Secreting Ebv-Transformed Human B Cells in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142(2), 256-263.
- Ulrich, A., Wichser, A., Hess, A., Heeb, N., Emmenegger, L., Czerwinski, J., . . . Mayer, A. (2012, 24-27 june). *Particle and Metal Emissions of Diesel and Gasoline Engines-Are Particle Filters Appropriate Measures?* Paper presented at the 16th Conference on Combustion Generated Nanoparticles, Zurich, Switzerland, June.
- Vakharia, D. D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.-Y., & Kaminsky, L. S. (2001). Effect of Metals on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Induction of Cyp1a1 and Cyp1a2 in Human Hepatocyte Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 170(2), 93-103. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.2000.9087>
- Valenta, R. (2002). The Future of Antigen-Specific Immunotherapy of Allergy. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 446-453.
- Vallejo, M., Jáuregui-Renaud, K., Hermosillo, A. G., Márquez, M. F., & Cárdenas, M. (2003). Efectos De La Contaminación Atmosférica En La Salud Y Su Importancia En La Ciudad De México. *Gaceta Médica de México*, 139, 57-63.
- Van Miert, E., Dumont, X., & Bernard, A. (2005). Cc16 as a Marker of Lung Epithelial Hyperpermeability in an Acute Model of Rats Exposed to Mainstream Cigarette Smoke. *Toxicology letters*, 159(2), 115-123.
- Vanspauwen, M., Linssen, C., Bruggeman, C., Jacobs, J., Drent, M., Bergmans, D., & Van Mook, W. (2009). Clara Cell Protein in Bronchoalveolar Lavage Fluid: A Predictor of Ventilator-Associated Pneumonia? *Critical Care*, 13, 1-2.
- Vargas, M. H. (2009). Epidemiología Del Asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 68(S2), S91-S97.
- Vargas, M. H., Sommer, B., Bazán-Perkins, B., & Montaña, L. M. (2010). Airway Responsiveness Measured by Barometric Plethysmography in Guinea Pigs. *Veterinary Research Communication*, 34(7), 589-596.
- Vega, E., Ruiz, H., Escalona, S., Cervantes, A., Lopez-Veneroni, D., Gonzalez-Avalos, E., & Sanchez-Reyna, G. (2011). Chemical Composition of Fine

- Particles in Mexico City During 2003-2004. *Atmospheric Pollution Research*, 2(4), 477-483. doi: 10.5094/APR.2011.054
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., . . . Frías-Villegas, A. (2006). Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Extractable Organic Matter from Airborne Particles  $\leq 10\mu\text{m}$  in Southwest Mexico City. *Atmospheric Environment*, 40(30), 5845-5857.
- Wang, S.-Z., Rosenberger, C. L., Bao, Y.-X., Stark, J. M., & Harrod, K. S. (2003). Clara Cell Secretory Protein Modulates Lung Inflammatory and Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 171(2), 1051-1060.
- Wang, Y.-H., & Wills-Karp, M. (2011). The Potential Role of Il-17 in Severe Asthma. *Current allergy and asthma reports*, 11(5), 388-394. doi: 10.1007/s11882-011-0210-y
- West, J. B. (2008). *Fisiopatología Pulmonar*. España: Wolters Kluwer and Lippincott Williams & Wilkins.
- Williams, J. W., Tjota, M. Y., & Sperling, A. I. (2012). The Contribution of Allergen-Specific Igg to the Development of Th2-Mediated Airway Inflammation. *Journal of allergy*, 2012.
- Yamazaki, S., Shima, M., Yoda, Y., Oka, K., Kurosaka, F., Shimizu, S., . . . Yamamoto, N. (2013). Association between Pm and Primary Care Visits Due to Asthma Attack in Japan: Relation to Beijing's Air Pollution Episode in January 2013. *Environmental Health and Preventive Medicine*. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12199-013-0371-5>
- Zhao, L., Song, Y., Pu, J., Guo, J., Wang, Y., Chen, Z., . . . Jia, G. (2014). Effects of Repeated Cr(Vi) Intratracheal Instillation on Club (Clara) Cells and Activation of Nuclear Factor-Kappa B Pathway Via Oxidative Stress. *Toxicology Letters*, 231(1), 72-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.011>
- Zuurbier, M., Hoek, G., Oldenwening, M., Meliefste, K., Krop, E., van den Hazel, P., & Brunekreef, B. (2011). In-Traffic Air Pollution Exposure and Cc16, Blood Coagulation, and Inflammation Markers in Healthy Adults. *Environmental Health Perspectives*, 119(10), 1384.

# 13 ANEXO I (Artículo requisito)

Environmental Pollution 228 (2017) 474–483



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)



## Inhalation of concentrated PM<sub>2.5</sub> from Mexico City acts as an adjuvant in a guinea pig model of allergic asthma<sup>☆</sup>



Carlos Iván Falcon-Rodríguez<sup>a, b</sup>, Andrea De Vizcaya-Ruiz<sup>c</sup>, Irma Aurora Rosas-Pérez<sup>d</sup>,  
Álvaro Román Osornio-Vargas<sup>e</sup>, Patricia Segura-Medina<sup>b, \*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria (CU), Del. Coyoacán, C.P. 04510 Ciudad de México (CDMX), Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Investigación en Hiperactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Calz. de Tlalpan 4502, Col. Belisario Domínguez, Sección XVI, Del. Tlalpan, C.P. 14080 Ciudad de México (CDMX), Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Toxicología de Contaminantes Atmosféricos y Estrés Oxidativo, Departamento de Toxicología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV)-Zacatenco, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, C.P. 07360 Ciudad de México (CDMX), Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Aerobiología, Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, Av. Universidad 3000, CU, Del. Coyoacán, C.P. 04360 Ciudad de México (CDMX), Mexico

<sup>e</sup> Department of Pediatrics, University of Alberta, 3-591 Edmonton Clinic Health Academy, 11405 87th Avenue, Edmonton T6G 1C9, Canada

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 October 2016

Received in revised form

16 May 2017

Accepted 17 May 2017

#### Keywords:

Air pollution

Fine particles

Sensitization

Ovalbumin

Adjuvant

### ABSTRACT

Exposure to Particulate Matter (PM) could function as an adjuvant depending on the city of origin in mice allergic asthma models. Therefore, our aim was to determine whether inhalation of fine particles (PM<sub>2.5</sub>) from Mexico City could act as an adjuvant inducing allergic sensitization and/or worsening the asthmatic response in guinea pig, as a suitable model of human asthma. Experimental groups were Non-Sensitized (NS group), sensitized with Ovalbumin (OVA) plus Aluminum hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>) as adjuvant (S + Adj group), and sensitized (OVA) without adjuvant (S group). All the animals were exposed to Filtered Air (FA) or concentrated PM<sub>2.5</sub> (5 h/daily/3 days), employing an aerosol concentrator system, PM<sub>2.5</sub> composition was characterized. Lung function was evaluated by barometric plethysmography (Penh index). Inflammatory cells present in bronchoalveolar lavage were counted as well as OVA-specific IgG1 and IgE were determined by ELISA assay. Our results showed in sensitized animals without Al(OH)<sub>3</sub>, that the PM<sub>2.5</sub> exposure (609 ± 12.73 µg/m<sup>3</sup>) acted as an adjuvant, triggering OVA-specific IgG1 and IgE concentration. Penh index increased ~9-fold after OVA challenge in adjuvant-sensitized animals as well as in S + PM<sub>2.5</sub> group (~6-fold), meanwhile NS + FA and S + FA lacked response. S + Adj + PM<sub>2.5</sub> group showed an increase significantly of eosinophils and neutrophils in bronchoalveolar lavage. PM<sub>2.5</sub> composition was made up of inorganic elements and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, as well as endotoxins and β-glucan, all these components could act as adjuvant. Our study demonstrated that acute inhalation of PM<sub>2.5</sub> acted as an adjuvant, similar to the aluminum hydroxide effect, triggering allergic asthma in a guinea pig model. Furthermore, in sensitized animals with aluminum hydroxide an enhancing influence of PM<sub>2.5</sub> exposure was observed as specific-hyperresponsiveness to OVA challenge (quickly response) and eosinophilic and neutrophilic airway inflammation. Fine particles from Mexico City is a complex mix, which play a significant role as adjuvant in allergic asthma.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Background

Asthma is a heterogeneous disorder characterized by airway inflammation (Flenley, 1986) and hyperresponsiveness, resulting in an exaggerated bronchoconstriction response (Postma and Kerstjens, 1998). This airway constriction is reversible, either spontaneously or in response to treatment (Flenley, 1986). The acute inflammatory response in allergic asthma involves IgE

<sup>☆</sup> This paper has been recommended for acceptance by David Carpenter.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [cirf84@hotmail.com](mailto:cirf84@hotmail.com) (C.I. Falcon-Rodríguez), [avizcaya@cinvestav.mx](mailto:avizcaya@cinvestav.mx) (A. De Vizcaya-Ruiz), [iarp@atmosfera.unam.mx](mailto:iarp@atmosfera.unam.mx) (I.A. Rosas-Pérez), [osornio@ualberta.ca](mailto:osornio@ualberta.ca) (Á.R. Osornio-Vargas), [psegura@unam.mx](mailto:psegura@unam.mx) (P. Segura-Medina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.050>

0269-7491/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



antibodies and Th2 cytokine production from activated lymphocytes (Lemanske and Busse, 2010). Some of the morphological changes that worsen asthma include airway remodeling, epithelium shedding, loss of ciliated cells, and goblet cell hyperplasia (Al-Muhsen et al., 2011). Epidemiological studies identify that >300 million persons suffer from this condition worldwide (Pawankar, 2014), with an estimated increase of 100 million more cases by 2025 (Bahadori et al., 2009). Human and animal studies suggest that air pollution could explain some of the increased asthma prevalence, but this process continues to remain unclear (Takizawa, 2011). In urban cities, we can find some gases (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, and Volatile Organic Compounds [VOC]) and a mixture of solids or liquid Particulate Matter (PM) (Brauer et al., 2002), which are ubiquitous pollutants suspended in the atmosphere (Curtius, 2006). PM originates from natural or anthropogenic sources. Natural sources include sea spray, volcanic eruptions, forest fires, geologic erosion, and aerobiological sources, such as animal dandruff, mites, pollen, bacteria, viruses, proteins, and carbohydrates (Curtius, 2006). Furthermore, urban anthropogenic sources emissions are mainly emissions from industrial activities and urban transportation (Calvo et al., 2013). In cities, the number of motor vehicles represents the main source of air pollution, including PM generated from the combustion of gasoline and diesel (Ulrich et al., 2012). PM can be inhaled, penetrating the respiratory tract, where they target different anatomical sites. Depending on its aerodynamic size, PM is categorized as PM<sub>10</sub> or coarse fraction, or as Fine Particles (FP) or PM<sub>2.5</sub> (Nemmar et al., 2013). In the lung, particles are more easily deposited than gases (Shusterman, 2011) and can be adsorbed by the epithelium, inducing tissue damage (Zhang et al., 2001) by means of the production of Reactive Oxygen Species (ROS). Reported tissue damage includes lung endothelial-cell dysfunction, inflammation (Sancini et al., 2014), and lung cancer (Valavanidis et al., 2013), as well as decreased lung function (Möller et al., 2013). PM exposure also aggravates Chronic Obstruction Pulmonary Disease (COPD) (Valavanidis et al., 2013), pulmonary fibrosis, and allergic asthma (Jones and Richeldi, 2014). Some reports mention that Diesel Exhaust Particles (DEP) produce airway hyperresponsiveness in a dose-response manner (Li et al., 2007). Studies in mouse asthma models have supported the hypothesis that instilled PM<sub>2.5</sub> fractions can induce or aggravate allergies, especially allergic asthma. Furthermore, Steerenberg et al. (2004) demonstrated that the instillation of PM collected in different European cities evoked adjuvant activity in a mouse model of allergic sensitization, which differed in severity according to city-of-origin (Steerenberg et al., 2004).

Thus, the aim of our study was to determine whether exposure to FP from Mexico City can induce an adjuvant effect on the airway hyperresponsiveness of allergic model in guinea pig, including changes such as bronchoconstriction, airway inflammation, and mucous metaplasia. The guinea pig model reproduces features of human asthma, such as airway hyperresponsiveness, inflammatory response, and bronchoconstriction better than any other rodent model.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Locality

Mexico City is located in Valley of Mexico at 2240 m above sea level in a subtropical region (Velasco et al., 2005) surrounded by mountain ridges in its eastern, western, and southern sides with a broad opening to the north. As a result, mountain breezes occur and are frequently essential to local circulation. During daytime, the mountains heated up, producing up-slope winds from the city to the mountains. During nighttime, the mountains cool down,

resulting in strong down-slope winds from the mountains to the city (Tie et al., 2007). The city experiences mild weather, temperatures of >20 °C, and intense solar radiation all year (Velasco et al., 2005).

### 2.2. Animals

Thirty Hartley guinea pigs (weighing 450–500 g each) were maintained under conventional conditions [12 h/12 h light/dark cycles, filtered conditioned air (21 ± 1 °C; 50–70% humidity), and sterilized bedding] at our Institution's animal facilities. Animals were fed *ad libitum* with food pellets (Teklad Guinea Pig Diet 7006; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) and drank sterilized water. The protocol was approved by the Scientific and Bioethics Committees of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (approval #B17-12). Experiments were conducted according to the criteria of the Guiding Principles in the Care and Use of Animals published and approved by the American Physiological Society (APS). Guinea pigs were sensitized on day 1 by a single injection (1-mL) intraperitoneally (i.p.) (0.5-mL) and subcutaneously (s.c.) (0.5-mL) of 60 mg OVA (OVA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) as antigen and 1 mg of Aluminium hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>) as adjuvant in 10 mL saline (0.9% NaCl). On days 8 and 15, the animals were nebulized with 3 mg/mL and 0.5 mg/mL OVA in saline during 5 min and 1 min, respectively. Aerosolized OVA was delivered utilizing an ultrasonic nebulizer (Model WH-802; Yuehua Medical Instrument Factory Co., Guangdong, China).

### 2.3. Particle exposure

The concentrator system is localized in the North of Mexico City, at CINVESTAV-IPN Zacatenco. Experiments were conducted during the rainy season in October 2013 (from 8 a.m. to 1 p.m.) during 3 days (1–3 October). The aerosol concentrator system is allocated within an enclosed laboratory that has a secondary barrier enclosure (Bio-Bubble Systems, Inc., Fort Collins, CO, USA). The bio-bubble barrier is a double air-lock entry system that is operated under negative pressure to reduce airborne particulates to Class 100 clean-room conditions; therefore, all conditions within the laboratory were controlled. Particle exposures were performed in whole-body chambers associated with this particle concentrator, where temperature and humidity were constant in each exposure chamber. The particulate concentrator had a particle cut-off size of 2.5 μm. To estimate particulate chamber concentration, we performed PM<sub>2.5</sub> ambient air monitoring using 37-mm Teflon filters that were weighed and equilibrated (PTFE 2-mm pore; Gelman Science, Ann Arbor, MI, USA) in a Mini-Vol sampler (Air Metrics, Eugene, OR, USA) with a 5.0 L/min air flow: the air ambient monitoring period followed the same schedule as that of the animal exposures. Particulate concentration in the chambers was estimated using a 37-mm teflon filter (PTFE 2-mm pore; Gelman Science) allocated in a holder inlet that received a 2.5-L/min constant airflow, the same air flow supplied in each chamber. Body mass was considered between control and the PM<sub>2.5</sub> group as air volume displacement; it was adjusted to 1.1 ± 0.2 kg per chamber at the beginning of each weekly experiment. Each chamber had a volume of 18 L/min.

### 2.4. Mass concentrator and inorganic analysis

Teflon filters inside the aerosol concentrator system and the Mini-Vol were weighed and equilibrated. During 3 days, the filters were stored at 4 °C and, at the end of the exposure, the filters were removed from cassettes or Mini-Vol, then weighed again to determine mass. Both the aerosol concentration system and the Mini-Vol



filters were used to determine  $PM_{2.5}$  inorganic composition was done by means of  $x$ -ray fluorescence following the procedure previously reported by Espinosa et al. (2012).

### 2.5. Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) were analyzed by Gas Chromatography-quadruple Mass Spectrometry (GC-qMS) (model 6890 plus/5973N; Agilent Technologies, CA, USA) following a procedure developed by Amador-Muñoz et al. (2014) (Amador-Muñoz et al., 2014) and Villalobos-Pietrini et al. (2006) (Villalobos-Pietrini et al., 2006).

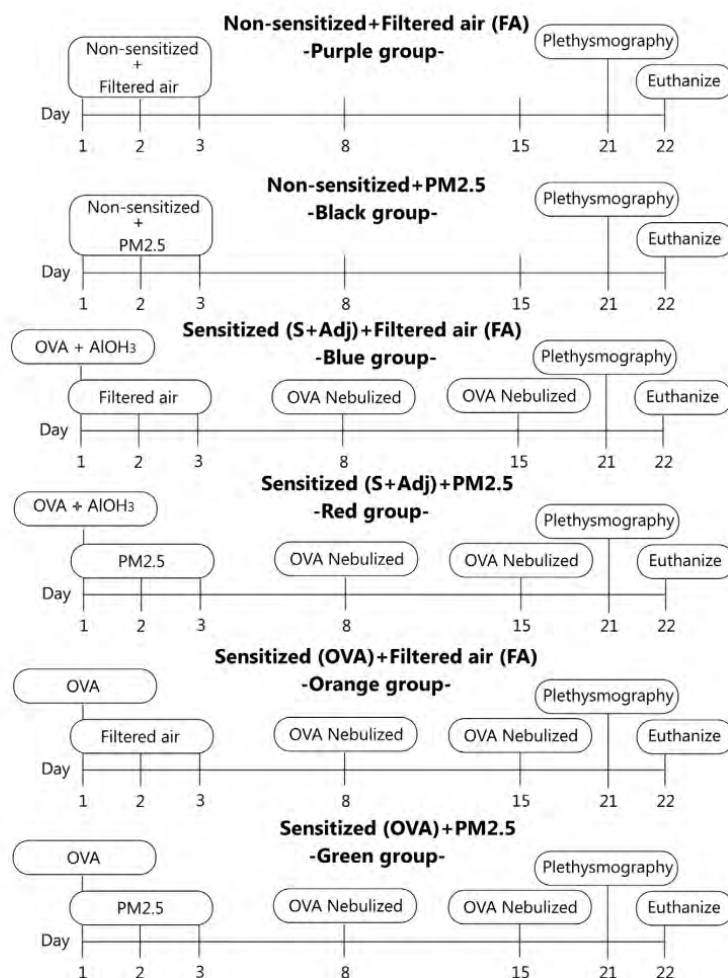
### 2.6. Endotoxin and glucan analysis

Endotoxins and (1-3)- $\beta$ -D-Glucan were evaluated by a Pyrochrome, Kinetic Chromogenic Method (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA). All PM samples were resuspended in pyrogen-free 50 mM Tris buffer (Lonza, Walkersville, MD, USA),

1 mg/mL, employing an UltraSound (US) water bath for 1 h at 22 °C, with 1-min intervals of agitation in the vortex during 15 min. Two serial 1:10 dilutions from each suspension were prepared. Control Standard Endotoxin (CSE) derived from *Escherichia coli* 0113:H10 (Lot 139; Associates of Cape Cod, Inc.) with a potency of 18 EU/ng and (1-3)- $\beta$ -D-Glucan standard 200 pg/mL (Lot 1189027; Associates of Cape Cod, Inc.) was used as reference. The samples were analyzed in duplicate utilizing a pyrogen-free tube reader and incubated at 37 °C in the Pyros Kinetix Flex Instrument (Associates of Cape Cod, Inc.). Optical Density (OD) was recorded at a wavelength of 405 nm. The digitized data were transmitted from the instrument to a computer and analyzed with Pyros EQS ver. 1.2 software.

### 2.7. Experimental design

To evaluate the adjuvant effect of  $PM_{2.5}$  in the guinea pig asthma model, we followed the next experimental design: All animals inhaled FA or  $PM_{2.5}$  for 5 h daily during 3 days. Non-Sensitized (NS)



**Fig. 1.** Experimental design. Day 1, animals were sensitized with a mix of OVA + Al(OH)<sub>3</sub> or with Ovalbumin (OVA) alone. Also, they inhaled Filtered Air (FA) or Particulate Matter (PM)<sub>2.5</sub> during 3 days: days 1, 2, and 3. On days 8 and 15, we applied OVA inhalation alone during 5 min and 1 min, respectively. On day 21, we performed the plethysmography test on all animals, and on day 22, we euthanized the animals. Two columns.

groups only inhaled FA or PM<sub>2.5</sub>. Two groups were sensitized with OVA plus Adjuvant (the S + Adj groups) and were subsequently exposed to FA or PM<sub>2.5</sub>. Another two groups were sensitized with OVA alone (the S groups) and exposed to FA or PM<sub>2.5</sub> (Fig. 1).

2.8. Plethysmography analysis

On day 21 of the sensitization procedure, a lung function test was performed after OVA inhalation (0.5 mg/mL/60 s) employing whole-body, single-chamber barometric plethysmography for freely moving animals (Buxco Electronics, Inc., Troy, NY, USA). We utilized an index known as Pause enhanced (Penh), which has shown to be an acceptable surrogate of airway resistance (Vargas et al., 2010). We measured a baseline index (Penh) immediately before the OVA challenge during 5 min. After the OVA challenge, we recorded during 15 min. We identified as positive response (i.e., respiratory distress) those that had a 2–6-fold Penh index increase

from the baseline value obtained prior to sensitization (100%). The result was reported as a percentage representing degree of hyperresponsiveness.

2.9. Bronchoalveolar lavage fluid

On day 22 after the OVA challenge, the animals were euthanized with a single injection (i.p.) of pentobarbital (35 mg/kg). The trachea was cannulated to administer 5 mL of saline solution (37 °C) by instillation twice. The recovered Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) was centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was stored at –20 °C for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) assay. Cells were resuspended in 1 mL saline and stained with Trypan blue for total cell count using a Neubauer chamber (Hauser Scientific, Horsham, PA, USA). After, were added 1 mL of saline solution per each 1 000, 000 counted cells and we performed a bronchoalveolar lavage smear on a slide using a

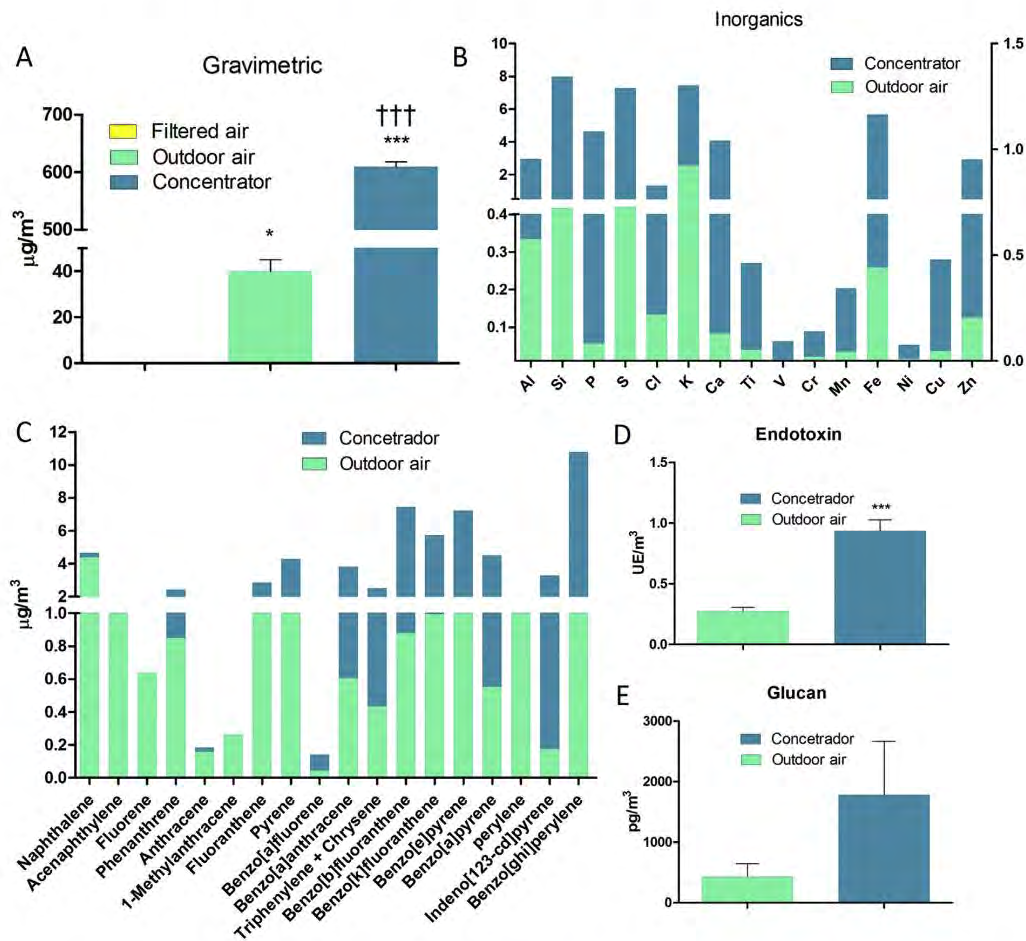


Fig. 2. PM<sub>2.5</sub> mass, composition of outdoor air, and concentrated air samples during the study period. (A) During this time, the animals inhaled Filtered Air (FA), whereas animals exposed to fine Particulate Matter (PM) inhaled a total average 600 µg/m<sup>3</sup> when outdoor PM<sub>2.5</sub> was around 40 µg/m<sup>3</sup>. (B) Several elements present in the PM<sub>2.5</sub> sample were concentrated at >1 µg/m<sup>3</sup> (Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, and Zn), whereas others were found at <0.5 µg/m<sup>3</sup> (Ti, V, Cr, Mn, Ni, and Cu). (C) Only 14 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) of the 18 considered were identified as concentrated in the PM<sub>2.5</sub> sample. Eleven PAH were concentrated at <2 µg/m<sup>3</sup>. Endotoxin (D) and glucan (E) were concentrated during this experiment. However, the only endotoxin exhibited differences. Values are reported as mean ± Standard Deviation (SD). Statistical analysis was performed using Student t-test (\*\*\*) *p* < 0.001). Two columns.



cyto centrifuge (Cyto-cent, Wescor, Inc., UT, USA). After this the slides were stained with Giemsa. Total cell count was expressed as cell/mL, and differential cell counts were expressed as a percentage of total cells.

### 2.10. Histological evaluation and morphometric analysis

After BALF, the lungs were fixed by instilling, intratracheally (i.t.) 10% buffered formalin and were immersed in the same fixative. The fixed tissue was paraffin-embedded and cut into 3.5- $\mu$ m sections. After this, the tissue was stained with Periodic Acid Schiff (PAS) for evaluation. We assessed goblet cell metaplasia by examining the bronchioles and counting the number of PAS-positive cells present in 20 bronchioles. Results are presented as percentage of PAS-positive cells of the total count of epithelial cells in each bronchiole.

### 2.11. ELISA assay

The stored supernatants were used to determine the presence of unspecific Immunoglobulin G (564155), specific-OVA IgG1 (746691), specific-OVA Immunoglobulin E (IgE) (701476), and CC16 protein (724602) (MyBioSource, San Diego, CA, USA) by ELISA utilizing duplicates and following the manufacturer's instructions.

### 2.12. Statistical analysis

Multiple group comparisons were analyzed using Analysis Of Variance (ANOVA) (Tukey) and pair of groups using the Student *t*-test from GraphPad Prism ver. 5 software (USA). We considered *p* < 0.05 as statistically significant.

## 3. Results

Animals inhaled concentrated PM<sub>2.5</sub> or FA for 5 h during 3 days. The average concentrated air particle in the chambers was 609  $\pm$  12.73  $\mu$ g/m<sup>3</sup>, and outdoor-air PM<sub>2.5</sub> collected 40  $\pm$  7.07  $\mu$ g/m<sup>3</sup>,

representing ~15-fold enrichments (Fig. 2A). Elemental and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) PM content also increased in the concentrated outdoor air (Fig. 2B and C), as well as endotoxins (Fig. 2D), and  $\beta$ -glucan (Fig. 2E). No PM<sub>2.5</sub> was present in FA chambers.

### 3.1. Plethysmography measurements

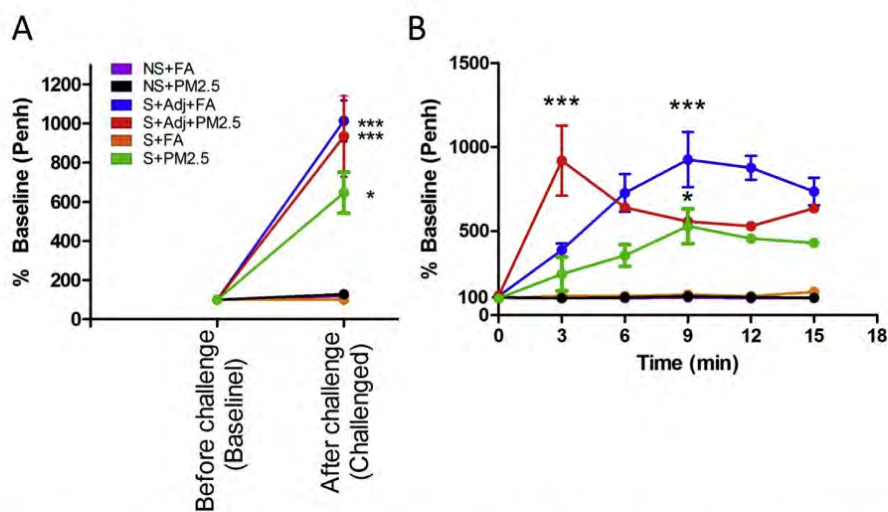
The Penh index measured before and after the OVA challenge on day 21 showed that PM<sub>2.5</sub> inhalations in sensitized animals (S + Adj) induced a significant ~9-fold increase above the Penh baseline. In the S + PM<sub>2.5</sub> group, there was a nearly ~6-fold increase in the Penh index (Fig. 3A). Penh index response in time exhibited hyperresponsiveness in S + Adj + PM<sub>2.5</sub> observed at 3 min after the OVA challenge. In contrast, the Penh index in animals from the S + PM<sub>2.5</sub> group increased 9 min after the OVA challenge, demonstrating a slower response (Fig. 3B). In the S + Adj + PM<sub>2.5</sub> group, the OVA challenge demonstrated a typical response, presenting higher Penh after 9 min in the OVA challenge. Non-sensitized animals (NS + FA, NS + PM<sub>2.5</sub>, or S + FA) lacked response.

### 3.2. Cellular count

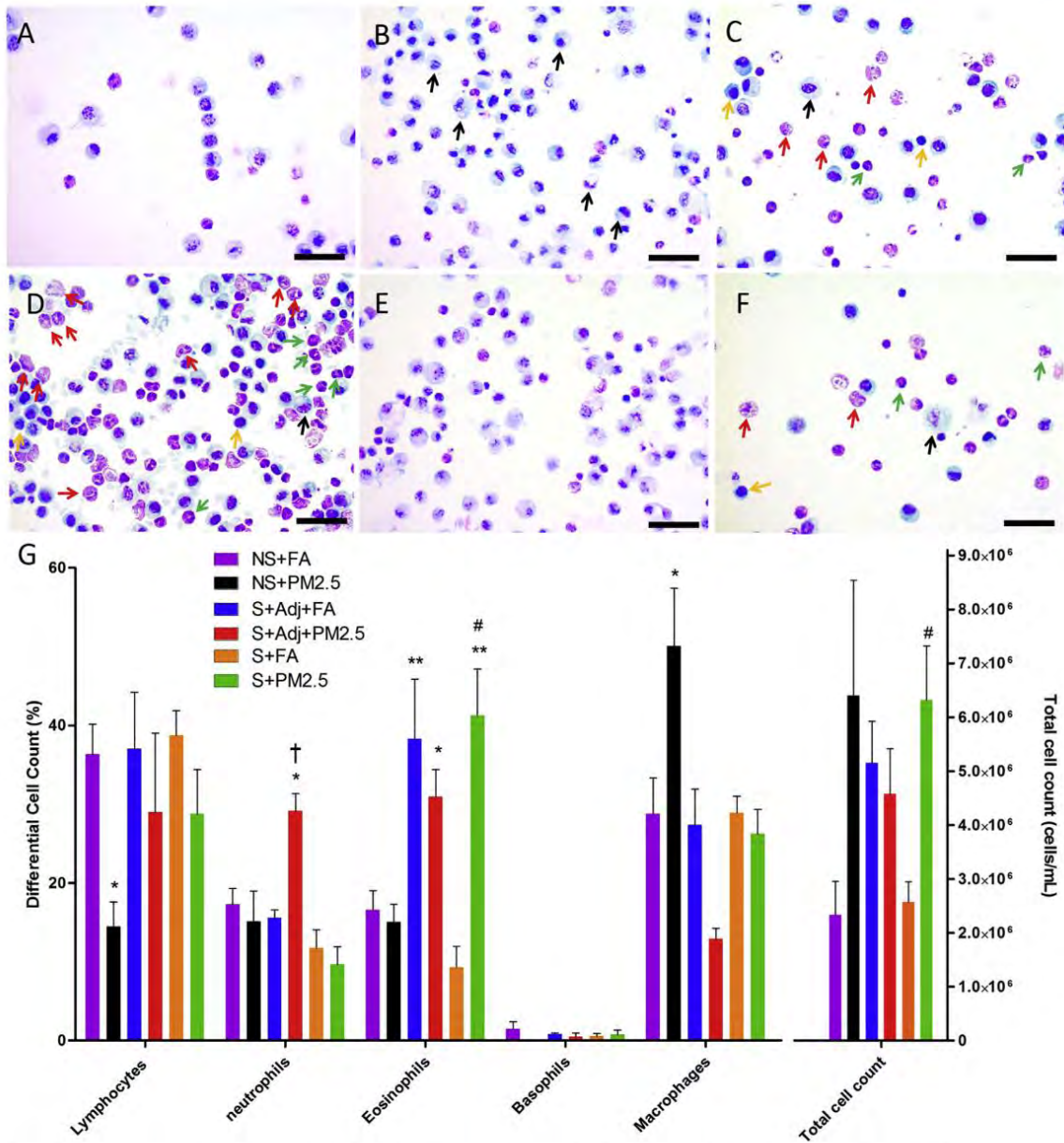
Giemsa stain analysis revealed (Fig. 4A–F) that exposure to PM<sub>2.5</sub> significantly elevated the percentage of macrophages in the NS + PM<sub>2.5</sub> group. However, in the S + Adj + FA and S + PM<sub>2.5</sub> groups, only eosinophils demonstrated an increase. In the case of animals from the S + Adj + PM<sub>2.5</sub> group, both eosinophils and neutrophils showed an increase. Total cell count only exhibited statistically significant differences in the S + PM<sub>2.5</sub> vs. the S + FA group (Fig. 4G).

### 3.3. ELISA assay

The non-specific IgG antibody levels lacked significant differences among groups (Fig. 5A). Sensitized animals receiving Al(OH)<sub>3</sub>



**Fig. 3.** Barometric plethysmography before and after the OVA challenge. (A) S + Adj + PM<sub>2.5</sub> or S + Adj + FA raised the bronchoobstruction index by around 1000%. ANOVA (Tukey) test vs. NS + FA (\*\**p* < 0.001). Also, S + PM<sub>2.5</sub> also increased the Penh index up to 600%. ANOVA (Tukey) test vs. NS + FA (\**p* < 0.05). (B) Over time, exposure to Fine Particles (FP) in S + Adj + PM<sub>2.5</sub> produced great bronchoobstruction at 3 min after the OVA challenge, ANOVA (Tukey) test vs. NS + FA (\*\**p* < 0.001). The same occurred in S + Adj + PM<sub>2.5</sub> but, at 9 min, a typical sensitization response was demonstrated. S + PM<sub>2.5</sub> also responded at 9 min, similar to the previous group, ANOVA (Tukey) test vs. NS + FA (\**p* < 0.05). Each value is reported as mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) *n* = 5. Two columns.

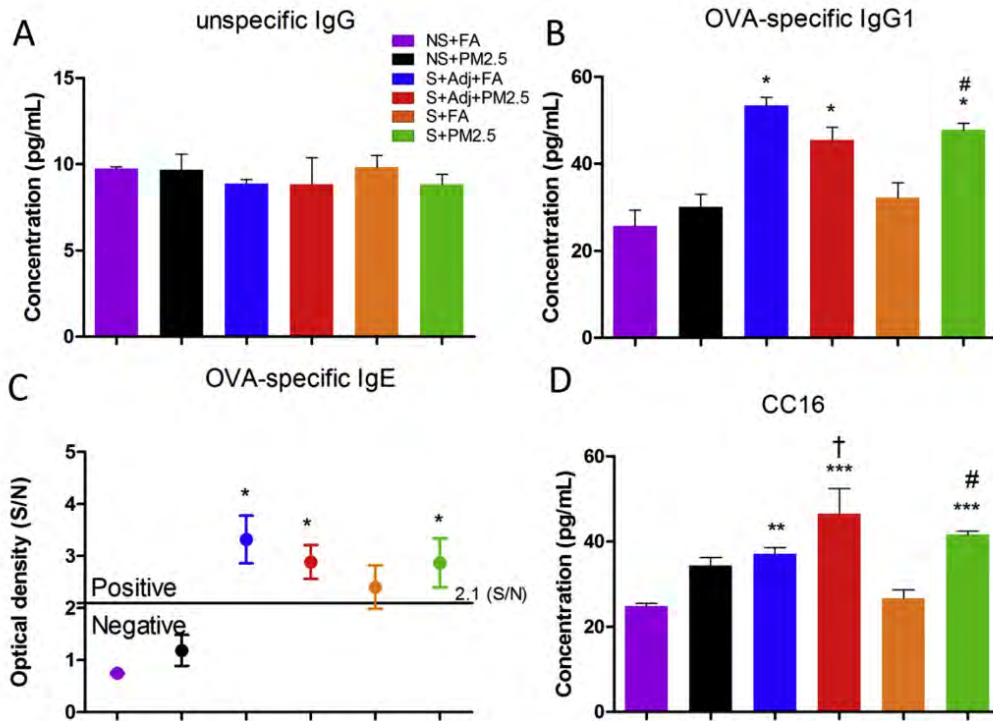


**Fig. 4.** Cell count in bronchoalveolar lavage fluid. (A) NS + FA; (B) NS + PM<sub>2.5</sub>; (C) S + Adj + FA; (D) S + Adj + PM<sub>2.5</sub>; (E) S + FA, and (F) S + PM<sub>2.5</sub>. Arrows indicate inflammatory cells; Macrophages (black); Lymphocytes (yellow); Eosinophils (red); Neutrophils (green). (G) Only PM<sub>2.5</sub> exposure raised macrophages, Student *t*-test (\*\**p* < 0.01 vs. NS + FA). Percentage of cell count. Neutrophils, Student *t*-test (\**p* < 0.05 vs. NS + FA), and eosinophils, Student *t*-test (\*\**p* < 0.01 vs. NS + FA) increased in S + Adj + PM<sub>2.5</sub>. S + PM<sub>2.5</sub> increased eosinophils, Student *t*-test (\*\**p* < 0.01 vs. NS + FA). However, S + Adj + PM<sub>2.5</sub> raised neutrophils more than its counterpart, Student *t*-test (†*p* < 0.05 vs. S + Adj + FA). Total cell count only increased in S + PM<sub>2.5</sub>, Student *t*-test (#*p* < 0.05 vs. S + FA). Each value is reported as mean ± Standard Deviation (SD), *n* = 5. Two columns.

adjuvant (S + Adj + FA and S + Adj + PM<sub>2.5</sub> groups) exhibited significantly raised OVA-specific IgG1 levels. In sensitized animals with no additional adjuvant (S + PM<sub>2.5</sub>), these antibodies were also increased, indicating an adjuvant role of PM<sub>2.5</sub> (Fig. 5B).

Furthermore, OVA-specific IgE levels were positive in the same three groups (Fig. 5C). CC16 protein had constitutive concentrations in the NS + FA group, while in the NS + PM<sub>2.5</sub> group, animals showed a non-statistically significant increase in CC16 protein. In





**Fig. 5.** Damage and sensitization biomarkers. (A) IgG exhibited null differences among groups. (B) OVA-specific IgG1 levels rose in S + Adj + FA or S + Adj + PM<sub>2.5</sub>, and in S + PM<sub>2.5</sub>. Student *t*-test (\**p* < 0.05 vs. NS + FA). This latter group was also different from their counterparts, Student *t*-test (#*p* < 0.05 vs. S + FA). (C) OVA-specific IgE levels also increased in the same groups, Student *t*-test (\**p* < 0.05). (D) CC16 protein as damage biomarker demonstrated significant differences in S + Adj + FA, S + Adj + PM<sub>2.5</sub>, and S + PM<sub>2.5</sub>. Student *t*-test (\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 vs. NS + FA). However, PM<sub>2.5</sub> inhalations increased damage in S + Adj group animals (*p* < 0.05 vs. S + Adj + FA). S + PM<sub>2.5</sub> also rose significantly, Student *t*-test (#*p* < 0.05 vs. NS + FA). Each value is reported as mean ± Standard Deviation (SD), *n* = 5. Two columns.

the S + Adj + FA group, CC16 protein levels increased and were even higher in animals that inhaled PM<sub>2.5</sub> (Fig. 5D).

### 3.4. Histology analysis

The S + Adj + FA group had an increment in the number of bronchiolar mucous cells (40% of cells in the epithelium) vs. the 3–5% observed in the NS + FA group (Fig. 6A–F). Exposure to PM<sub>2.5</sub> raised the number of mucous cells to >70% and 60% in the S + Adj and S groups, respectively (Fig. 6G).

## 4. Discussion

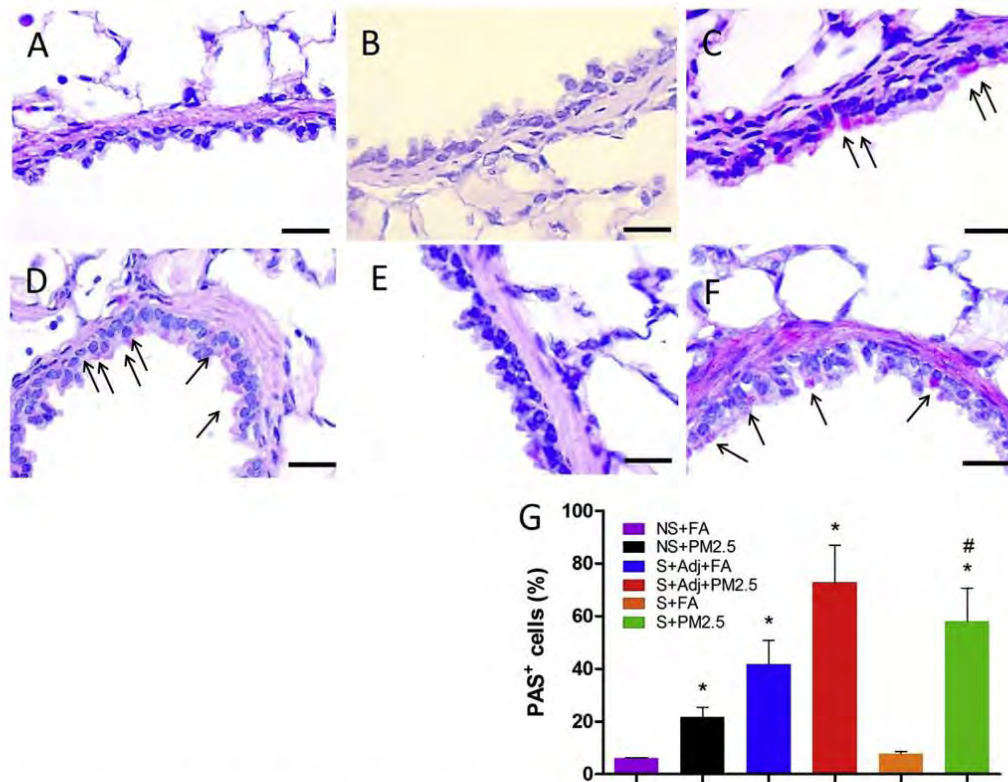
In the present study, we evaluated the adjuvant potential of Mexico City PM<sub>2.5</sub> and its pulmonary toxicological manifestations in a guinea-pig allergic asthma model. Our results revealed that a 3-day exposure to PM<sub>2.5</sub> alone was not capable of producing changes in allergic asthma biomarkers. Instead, both sensitized groups receiving adjuvant and PM<sub>2.5</sub> (S + Adj + PM<sub>2.5</sub>) or without adjuvant (S + PM<sub>2.5</sub>), responded with severe airway hyperresponsiveness, showing a faster response. PM<sub>2.5</sub> exposure induced severe airway hyperresponsiveness in animals sensitized with adjuvant (S + Adj + PM<sub>2.5</sub>), and the sensitized group (S + PM<sub>2.5</sub>) evidenced a slow hyperresponsiveness response. In both groups, OVA-specific IgG1 and IgE levels were increased. Previous studies have suggested that in animals sensitized with antigen alone, the IgG1 antibody can be detected in the serum, but when it is administered

with an adjuvant, both IgG1 and IgE are present in the serum (Andersson, 1980), as occurred in S + PM<sub>2.5</sub> groups. Similar findings were observed in an allergic-asthma mouse model with exposure to DEP, where the latter acted as an adjuvant, elevating OVA-specific IgG and IgE (Hao et al., 2003). Also, in a mouse model, intranasal (i.n.) instillation of fine particles gave rise to a stronger effect on OVA-specific IgE, IgG1, or IgG2a antibodies than coarse particles (Steerenberg et al., 2006). Additionally, Li et al. (2009) reported a greater increase in both antibodies when animals were OVA-sensitized and exposed to UltraFine Particles (UFP) in comparison to those that only received OVA sensitization (Li et al., 2009). However, this difference was not found in the present study, suggesting a differential effect related with the particle size tested.

Furthermore, it is known that exposure to endotoxins increased this antibody, although neither glucan nor the endotoxin + glucan mixture changed these antibody levels (Thorn and Rylander, 1998), as occurred in our analysis, which presented high levels of endotoxin and glucan, the result of which showed the same levels of non-specific IgG in our groups. It is clear that our results were obtained in animals exposed to very high PM<sub>2.5</sub> concentrations (609 ± 12.73 µg/m<sup>3</sup> for 3 days). Nevertheless, similar levels exist in some cities of Asia and the Middle East (Zhang and Cao, 2015; UNEP, 2016).

A characteristic of asthma or the sensitization process comprises the presence of pulmonary eosinophilia (Foster et al., 1996). However, in our study, S + Adj + PM<sub>2.5</sub>-group animals increased not





**Fig. 6.** Mucous metaplasia. (A) NS + FA; (B) NS + PM<sub>2.5</sub>; (C) S + Adj + FA; (D) S + Adj + PM<sub>2.5</sub>; (E) S + FA, and (F) S + PM<sub>2.5</sub>. Arrows indicate mucous cells in terminal bronchioles of the epithelium. Differential cell count (G). S + Adj + FA increased mucous cells, Student *t*-test (\**p* < 0.05 vs. NS + FA). In addition, exposure to PM<sub>2.5</sub> in S + Adj or S animals raised mucous metaplasia, Student *t*-test compared vs. NS + FA (\**p* < 0.05) or vs. S + FA (#*p* < 0.05), respectively. Each value is reported as mean ± Standard Deviation (SD), *n* = 5. Two columns.

only in eosinophils but also in neutrophils. Similar results were found by Steerenberg et al. (2005) when comparing PM from five European cities (Rome, Oslo, Amsterdam, Zilk, and Lodz) in the mouse model. Only particles from Lodz increased eosinophils, neutrophils, and monocytes in BALF (Steerenberg et al., 2005). Another study, UFP + DEP + OVA in a mouse model, raised mononuclear cells and eosinophils (Farraj et al., 2006; Li et al., 2009). It has been observed that eosinophilic inflammation is related with frequent asthma exacerbations, while a neutrophilic increase is responsible for severe airflow limitation (Lee et al., 2014). This effect was observed in our physiologic analysis by plethysmography in S + Adj + PM<sub>2.5</sub> animals, in which a high percentage of eosinophils and neutrophils was reported. Furthermore, in these animals, inhalation of PM<sub>2.5</sub> altered the bronchiolar epithelium, as demonstrated in a higher concentration of CC16 in the BALF than that observed in the S + Adj + FA group. Some chemicals, such as smoke, ozone, and PM, induced lung damage represented by an increase in CC16 protein due to disturbance of the integrity or permeability of the bronchiolar epithelium (Broeckaert, 2000). This protein appears to protect the respiratory tract against oxidative stress and inflammation, as demonstrated in experiments using CC16-deficient mice (Broeckaert, 2000). Studies in human revealed a positive correlation between PM<sub>10</sub> exposure and CC16 protein increments: for each 5-μg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> increase, a 0.52-μg/L rise in CC16 protein was observed in serum (Provost et al.,

2014). Also, in rats and in a mouse model, acute exposure to ozone produces a transient dose-dependent elevation of CC16 in serum (Broeckaert, 2000).

Damage to the integrity or permeability of the bronchiolar epithelium produces an increase in the sensitization process (Broeckaert, 2000) and in hyperresponsiveness. Moreover, during this exposure, the bronchiolar epithelium underwent mucous cell metaplasia, similar to our finding in the present study. Although mucous cells typically develop in the bronchiolar epithelium as part of the sensitization process (Reader et al., 2003), this effect increases when sensitized animals are exposed to particles. In bronchioles, the high levels of CC16 protein levels within some Club cells are transformed into a mucoid phenotype (Evans et al., 2004), whose degranulation is regulated by neutrophil elastase (Agusti et al., 1998). In this investigation, both mucous metaplasia and its neutrophils worsened bronchial obstruction, as was reported in our plethysmography studies.

Aluminum hydroxide worked as an excellent adjuvant in our experimental model, in that, if not administered, the animals would never have become “asthmatics” (results of our S + FA group). Aluminum hydroxide in allergen immunotherapy is associated with the induction of the Th2 response and the production of InterLeukin (IL)-4 and IL-5, and the specific IgG1 antibody (Brewer et al., 1999). Furthermore, exposure to Aluminum (Al) causes a pro-inflammatory effect mediated by the formation of ROS, which is



potentiated when Al is combined with another metal such as iron, producing the reduction of Fe III into Fe II and auto-oxidation of the latter (Exley et al., 2010). PM<sub>2.5</sub> is a big mixture of chemicals that recruits inflammatory and ROS formation in the airways (Dworski, 2000). Also, it is known that some PM<sub>2.5</sub> constituents affect the initial priming process and the subsequent allergen challenge, which enhances the production of specific IgE (Mahony et al., 2013) by the switching of B cells (Parnia et al., 2002), but only in co-stimulated B cells (Pandya et al., 2002). Some studies have recognized elements or compounds that play a major role as adjuvant, such as nickel (Gilmour et al., 2000), Silicon as SiO<sub>2</sub> (mesoporous silica nanoparticles) (Mahony et al., 2013), anthracene, fluoranthene, benzo(a)pyrene (Pandya et al., 2002), and phenanthrene (Tsiens et al., 1997). In our study, S + Adj + PM<sub>2.5</sub> and S + PM<sub>2.5</sub> groups inhaled high levels of a mix: Al; Si; Fe; Zn; benzo(a)anthracene; benzo(b,k)fluoranthene; benzo(a,e)pyrene; benzo(ghi)perylene; fluoranthene, and phenanthrene, which functioned as adjuvants, associating the activation of the type-2 inflammatory response and IgE and IgG production within the lungs in acute inhalation in the allergic guinea pig.

## 5. Conclusions

Our study demonstrated that acute inhalation during 3 days of fine particles from Mexico City acts as an adjuvant, similar to aluminum hydroxide, producing allergic asthma in a guinea pig model in animals sensitized with ovalbumin in the absence of an adjuvant. Furthermore, in sensitized animals that received aluminum hydroxide as an adjuvant, exposure to fine particles worsens bronchoconstriction, airway inflammation, and pulmonary damage. Fine particulate matter from Mexico City comprises a compound mixture. Knowing more about its composition is crucial to determine which of the chemical components play a significant role as adjuvants in allergic asthma.

## Funding

This research was supported by SECITI, grant numbers 042/2013, 014/2014, and 019/2015 Secretaría de Ciencia y Tecnología, Mexico City.

## Acknowledgments

The first author wishes to thank CONACYT for the Ph.D. scholarship, Becario #233789, and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for the training received during doctoral studies and to thank the Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECITI) of CDMX. Also, we are grateful to Rodolfo Angulo-Oláis, M.Sc., for technical assistance with animals, to Leticia Martínez, M.Sc., and Eva Salinas, M.Sc., for assistance in endotoxin and glucan determination, and to Brisa Samara Reyes-Nava for technical assistance throughout the work.

## References

- Agusti, C., Takeyama, K., Cardell, L.O., Ueki, I., Lausier, J., Lou, Y.-P., Nadel, J.A., 1998. Goblet cell degranulation after antigen challenge in sensitized Guinea pigs: role of neutrophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 1253–1258.
- Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., Hamid, Q., 2011. Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 451–462.
- Amador-Muñoz, O., Vázquez Santos-Medina, G., Jazcilevich-Diamant, A., Valle-Hernández, B., 2014. Dispositivo integrado por múltiples deflexiones para la recuperación de compuestos orgánicos debido a la evaporación de disolventes orgánicos por arrastre de vapor. Mexican patent 32 5625 2014.
- Andersson, P., 1980. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized Guinea-pigs: anti anaphylactic effects of sodium cromoglycate and aminophylline. *Br. J. Pharmacol.* 69, 467–472.
- Bahadori, K., Doyle-Waters, M.M., Marr, A. C., Lynd, L., Alasaly, K., Swiston, J., FitzGerald, J.M., 2009. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulmonary Med.* 9, 24.
- Brauer, M., Hoek, G., Van Vliet, P., Meliefste, K., Fischer, P.H., Wijga, A., Koopman, L.P., Neijens, H.J., Gerritsen, J., Kerkhof, M., Heinrich, J., Bellander, T., Brunekreef, B., 2002. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1092–1098.
- Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F., Alexander, J., 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13-mediated signaling. *J. Immunol.* 163, 6448–6454.
- Broeckaert, B., 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin. Exp. Allergy* 30, 469–475.
- Calvo, A., Alves, C., Castro, A., Pont, V., Vicente, A., Fraile, R., 2013. Research on aerosol sources and chemical composition: past, current and emerging issues. *Atmos. Res.* 120, 1–28.
- Curtius, J., 2006. Nucleation of atmospheric aerosol particles. *Comptes Rendus Phys.* 7, 1027–1045.
- Dworski, R., 2000. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 55, 51–53.
- Espinosa, A., Reyes-Herrera, J., Miranda, J., Mercado, F., Veytia, M., Cuautle, M., Cruz, J., 2012. Development of an x-ray fluorescence spectrometer for environmental science applications. *Instrum. Sci. Technol.* 40, 603–617.
- Evans, C.M., Williams, O.W., Tuvim, M.J., Nigam, R., Mixides, G.P., Blackburn, M.R., DeMayo, F.J., Burns, A.R., Smith, C., Reynolds, S.D., 2004. Mucin is produced by Clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 382–394.
- Exley, C., Siesjö, P., Eriksson, H., 2010. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 31, 103–109.
- Farraj, A.K., Haykal-Coates, N., Ledbetter, A.D., Evansky, P.A., Gavett, S.H., 2006. Neurotrophin mediation of allergic airways responses to inhaled diesel particles in mice. *Toxicol. Sci.* 94 (1), 183–192.
- Flenley, D., 1986. Reversible airway obstruction: neurohumoral mechanisms and treatment. *Respiration* 50, 57–64.
- Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I., Young, I.G., 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183, 195–201.
- Gilmour, M., Selgrade, M., Lambert, A., 2000. Enhanced allergic sensitization in animals exposed to particulate air pollution. *Inhal. Toxicol.* 12, 373–380.
- Hao, M., Comier, S., Wang, M., Lee, J.J., Nel, A., 2003. Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 905–914.
- Jones, M.G., Richeldi, L., 2014. Air pollution and acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: back to miasma? *Eur. Respir. J.* 43, 956–959.
- Lee, T.-H., Song, H.J., Park, C.-S., 2014. Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma. *Asia Pac. Allergy* 4, 187–196.
- Lemanske Jr., R.F., Busse, W.W., 2010. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 95–102.
- Li, N., Wang, M., Bramble, L.A., Schmitz, D.A., Schauer, J.J., Sioutas, C., Harkema, J.R., Nel, A.E., 2009. The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the particulate oxidant potential. *Environ. Health Perspect.* 117, 1116–1123.
- Li, Y.-J., Kawada, T., Matsumoto, A., Azuma, A., Kudoh, S., Takizawa, H., Sugawara, I., 2007. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains. *Exp. Lung Res.* 33, 227–244.
- Mahony, D., Cavallaro, A.S., Stahr, F., Mahony, T.J., Qiao, S.Z., Mitter, N., 2013. Mesoporous silica nanoparticles act as a self-adjuvant for ovalbumin model antigen in mice. *Small* 9, 3138–3146.
- Möller, A., Agius, R.M., Vocht, F., Lindley, A., Gerrard, W., Lowe, L., Belgrave, D., Custovic, A., Simpson, A., 2013. Long-term exposure to PM10 and NO2 in association with lung volume and airway resistance in the MAAS birth cohort. *Environ. Health Perspect.* 121, 1232–1238.
- Nemmar, A., Holme, J.A., Rosas, I., Schwarze, P.E., Alfaro-Moreno, E., 2013. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the *in vivo* and *in vitro* studies. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–22.
- Pandya, R.J., Solomon, G., Kinner, A., Balmes, J.R., 2002. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ. Health Perspect.* 110, 103–112.
- Parnia, S., Brown, J., Frew, A., 2002. The role of pollutants in allergic sensitization and the development of asthma. *Allergy* 57, 1111–1117.
- Pawankar, R., 2014. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organ. J.* 7, 1–12.
- Postma, D.S., Kerstjens, H.A.M., 1998. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 187–192.
- Provost, E.B., Chaumont, A., Kicinski, M., Cox, B., Fierens, F., Bernard, A., Nawrot, T.S., 2014. Serum levels of club cell secretory protein (Clara) and short- and long-term exposure to particulate air pollution in adolescents. *Environ. Int.* 68, 66–70.
- Reader, J.R., Tepper, J.S., Schelegle, E.S., Aldrich, M.C., Putney, L.F., Pfeiffer, J.W., Hyde, D.M., 2003. Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *Am. J. Pathology* 162, 2069–2078.
- Sancini, G., Farina, F., Battaglia, C., Cifola, I., Mangano, E., Mantecca, P., Camatini, M., Palestini, P., 2014. Health risk assessment for air pollutants: alterations in lung and cardiac gene expression in mice exposed to milano winter fine particulate

- matter (pm<sub>2.5</sub>). PLoS One 9, 10.
- Shusterman, D., 2011. The effects of air pollutants and irritants on the upper airway. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 101–105.
- Steenenberg, P.A., van Amelsvoort, L., Lovik, M., Hetland, R.B., Alberg, T., Halatek, T., Bloemen, H.J., Rydzynski, K., Swaen, G., Schwarze, P., 2006. Relation between sources of particulate air pollution and biological effect parameters in samples from four European cities: an exploratory study. *Inhal. Toxicol.* 18, 333–346.
- Steenenberg, P.A., Withagen, C.E.T., van Dalen, W.J., Dormans, J.A.M.A., Cassee, F.R., Heisterkamp, S.H., van Loveren, H., 2004. Adjuvant activity of ambient particulate matter of different sites, sizes, and seasons in a respiratory allergy mouse model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200, 186–200.
- Steenenberg, P.A., Withagen, E.T., van Dalen, W.J., Dorma, J.A.M.A., Heisterkamp, S.H., van Loveren, H., Cassee, F.R., 2005. Dose dependency of adjuvant activity of particulate matter from five European sites in three seasons in an Ovalbumin mouse model. *Inhal. Toxicol.* 17, 133–145.
- Takizawa, H., 2011. Impact of air pollution on allergic diseases. *Korean J. Intern. Med.* 26, 262–273.
- Thorn, J., Rylander, R., 1998. Inflammatory response after inhalation of bacterial endotoxin assessed by the induced sputum technique. *Thorax* 53, 1047–1052.
- Tie, X., Madronich, S., Li, G., Ying, Z., Zhang, R., García, A.R., Lee-Taylor, J., Liu, Y., 2007. Characterizations of chemical oxidants in Mexico City: a regional chemical dynamical model (WRF-Chem) study. *Atmos. Environ.* 41.9, 1989–2008.
- Tsien, A., Díaz-Sánchez, D., Ma, J., Saxon, A., 1997. The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 256–263.
- United Nations Environment Programme (UNEP), 2016. *A Review of Air Pollution Control in Beijing: 1998–2013*. <http://www.bjepb.gov.cn/bjepb/323265/340674/4389403/2016052511264687868.pdf> (Accessed on 27 January 2017).
- Ulrich, A., Wichser, A., Hess, A., Heeb, N., Emmenegger, L., Czerwinski, J., Kasper, M., Mooney, J., Mayer, A., 2012. Particles and Metal Emissions of Diesel and Gasoline Engines - Are Particle Filters Appropriate Measures? 16th Conference on Combustion Generated Nanoparticles, Zürich, Switzerland.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loidas, S., 2013. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 3886–3907.
- Vargas, M.H., Sommer, B., Bazán-Perkins, B., Montano, L.M., 2010. Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in Guinea pigs. *Veterinary Res. Commun.* 34, 589–596.
- Velasco, E., Pressley, S., Allwine, E., Westberg, H., Lamb, B., 2005. Measurements of CO<sub>2</sub> fluxes from the Mexico City urban landscape. *Atmos. Environ.* 39 (38), 7433–7446.
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, J.L., Frías-Villegas, A., 2006. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles ≤10 μm in southwest Mexico City. *Atmos. Environ.* 40, 5845–5857.
- Zhang, Y.L., Cao, F., 2015. Fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in China at a city level. *Sci. Rep.* 5, 14884.
- Zhang, Z., Kleinstreuer, C., Kim, C.S., 2001. Effects of curved inlet tubes on air flow and particle deposition in bifurcating lung models. *J. Biomechanics* 34, 659–669.



## 14 ANEXO II (Aprobación del proyecto)

 SECRETARÍA DE SALUD		 INER INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
--	---	--

"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

México D. F. a 18 de Junio de 2013  
INER/CI/050/13

Dra. Patricia Segura Medina  
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.  
**APROBACIÓN.**

Título del Proyecto: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CONCOMITANTE A OZONO Y AEROPARTÍCULAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO EN LA PATOGÉNESIS DEL ASMA.

Código asignado por el Comité: **B21-13**

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Mayo 2013	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de junio de 2013 a junio 2014.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente



Dr. Joaquín A. Zúñiga Ramos  
Presidente del Comité

Calzada de Tlalpan No. 4502, Cal. Sección XVI, Deleg. Tlalpan, México, D.F., C.P. 14080  
Tel. (55) 54 87 17 00 www.iner.salud.gob.mx